Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Würzburg, P. Ehrlich-Frankfurt a. M., F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. von Noorden-Frankfurt a. M., E. Salkowski-Berlin, F. Tangl-Budapest, A. von Wassermann-Berlin, N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Einundsiebzigster Band.

Erst

1915.



Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1915.




F.G.KOSTER·BOEKBINDER·




M

Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Würzburg, F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. v. Noorden-Frankfurt a. M., E. Salkowski-Berlin, F. Tangl-Budapest, A. von Wassermann-Berlin, N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Einundsiebzigster Band.



Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1915.



Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.

Inhaltsverzeichnis.

Fortgesetzte Untersuchungen über Carboxylase und andere Hefenfermente.

Von

Carl Neuberg.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Übersicht:

III. Propylalkohol,
IV. Isopropylalkohol,
V. Amylalkohol,
VI. Äthylenglykol,
VII. Glycerin,
VIII. Acetaldehyd,
IX. Acetaldehyd-Ammoniak,
X. Propylaldehyd,
XI. Aceton,
XII. Pyridin.

E. Vergleich der Vergärung höherer Ketosäuren in freier und gepufferter Form.
1. Vergärung durch frische Hefen,
2. Vergärung durch Macerationssäfte.

F. Gegenwart von Carboxylase in plasmolysierten Hefen.

G. Beziehungen der Carboxylase und ihrer Substrate zu anderen Hefenfermenten:
1. Unabhängigkeit der Carboxylase und der Invertase voneinander.
I. Wirkung von Invertase-Carboxylase in frischen Hefen.
II. Wirkung von Invertase-Carboxylase in Hefesäften.
2. Einfluß von Zucker auf die Gärung der Brenztraubensäure,
3. Einfluß von Brenztraubensäure auf die Gärung verschiedener Zucker,
I. Schädigender Einfluß von freier Brenztraubensäure auf die Wirkung der Gärungsfermente Carboxylase und „Zymase“.
II. Fördernder Einfluß von kleinen Mengen brenztraubensaurer Salze auf die Gärung verschiedener Zucker.
4. Einfluß von Salzen höherer Ketosäuren auf die Gärung verschiedener Zuckerarten. (Über eine unmittelbare Beziehung des Aminosäurenstoffwechsels zur Gärung.)

H. Minimumversuche. (Vergleiche über den Umfang der Vergärung, die durch kleinste Mengen Hefe in

Zucker- und Brenztraubensäurelösungen hervorgebracht wird.)

1. Versuche mit frischen Hefen,
2. Versuche mit Macerationssaft.

J. Erfahrungen über die Selbstgärung von Macerationssäften nach dem Ausfall von 67 Proben.

K. Über das Verhalten von Invertaselösung bei jahrelanger Aufbewahrung.

Als einen neuen Gesichtspunkt in der Chemie der Gärungserscheinungen darf man wohl die Auffindung eines Enzyms betrachten, dessen Hauptwirkung in der Abspaltung von Kohlendioxyd aus organischen Säuren besteht. Damit ist die Entstehung von Gärungskohlensäure den früheren unfruchtbaren Spekulationen entzogen und auf eine experimentelle Grundlage gehoben worden. Denn es ist klar, daß nur aus Carbonsäuren, d. h. als Zwischenstufe auftretenden Substanzen mit Carboxylgruppe, CO_2 so schnell und so reichlich hervorgehen kann, wie es beim Gärakte der Fall ist. Dieses Ferment, die Carboxylase, ist im Jahre 1910 von mir in den Hefen aufgefunden; über dieselbe haben meine Mitarbeiter und ich in 16 Mitteilungen über die „Zuckerfreie Hefengärungen" und in einer Anzahl anderer damit zusammenhängender Veröffentlichungen berichtet. Im Laufe der Zeit haben wir nun bei der fortgesetzten Beschäftigung mit diesem Gegenstande eine Reihe von Beobachtungen gesammelt, die z. T. die alten Befunde bestätigen und erweitern, z. T. neue Eigenschaften der Hefencarboxylase kennen gelehrt haben. In ihrer Gesamtheit greifen diese Feststellungen in verschiedene Seiten des Gärungsproblems ein. Ihre Wiedergabe, die sich infolge der Zeitverhältnisse um ein Jahr verzögert hat, möge in der Reihenfolge der voranstehenden Übersicht erfolgen.

A. Haltbarkeit der Carboxylase.

1. Haltbarkeit der Carboxylase in zellfreien Dauerpräparaten.

Bei mehreren Gelegenheiten[1]) ist die große Beständigkeit der Carboxylase betont worden. C. Neuberg und P. Rosen-

---

[1]) Vgl. C. Neuberg und P. Rosenthal, diese Zeitschr. 51, 142, 1913.

thal[1]) haben die Darstellung eines Dauerpräparates von Carboxylase beschrieben, das aus nativen wie „inaktivierten“ (s. S. 22) Macerationssäften gewonnen werden kann. Präparate, die am 20. V. 1913 aus Trockenhefe von Schroder aus München — im folgenden als Hefe S bezeichnet — dargestellt waren, besaßen am 20. VII. 1914 noch volle Wirksamkeit[2]). Aus dem Macerationssaft aus getrockneter Berliner Hefe UM konnten ebenfalls wirksame Dauerpräparate gewonnen werden.

Das gilt sowohl für die Dauerpräparate aus frischem Macerationssaft als für Präparate, die aus den zuvor auf 51 bis 54° erhitzten (in bezug auf Zymase inaktivierten) Säften gewonnen waren.

Versuch a.

2,0 g Aceton-Dauerpräparat[1]) S wurden im Mörser in einem Gemisch von 10 ccm 2 m-Brenztraubensäure plus 10 ccm 2 m-K_2HPO_4 unter Verreiben gelöst. Nach dem Einbringen in ein Eudiometer begann bei 30° sofort die Gärung. Nach 2 Minuten war dieselbe stürmisch, nach 1 Stunde waren 8 ccm, nach 2 Stunden 11 ccm Kohlendioxyd entbunden.

Versuch b.

2,0 g desselben Präparates wurden mit einer Lösung von 0,17 g freier Brenztraubensäure in 20 ccm Wasser verrieben. Das stark getrübte Gemisch zeigte bei 30° im Eudiometer nur Spuren einer Gasentwicklung. Nach 30 Minuten trat starke Gelatinierung ein. Nach 20 Stunden hatten sich nur 0,5 ccm Gas angesammelt.

Dieser Versuch zeigt sehr deutlich die ungünstige Wirkung der freien Brenztraubensäure auf ihre eigene Vergärung im Vergleich mit dem gepufferten Material. (Vgl. S. 25 bis 49.)

Versuch c.

1,0 g Aceton-Dauerpräparat aus inaktiviertem Macerationssaft S wurde in 10 ccm des Gemisches von 2 m-Brenztraubensäurelösung und 2 m-H_2HPO_4 gelöst. Bei 30° entwickelten sich aus der schwach getrübten Flüssigkeit sofort Gasblasen. Ihre Menge betrug nach 1 Stunde 5 ccm, nach 2 Stunden 9 ccm.

---

[1]) C. Neuberg und P. Rosenthal, diese Zeitschr. 61, 174, 1914.

[2]) Anm. b. d. Korrektur: auch noch am 15. 12. 1914.

Zu den nachfolgenden Versuchen d und e diente ein Macerationssaft aus selbstgetrockneter Berliner Unterhefe UM bzw ein daraus gewonnenes Acetontrockenpräparat.

Der Saft aus der genannten Unterhefe UM wurde 10 Minuten lang im Wasserbade auf 54 bis 55° erhitzt und von der dabei entstandenen dichten Eiweißfällung abfiltriert. Das Filtrat, das völlig klar und schwach gelbbraun gefärbt war, enthielt noch reichlich in der Hitze koagulierendes Eiweiß. Dieser so behandelte Saft, der eine 9%ige Glucoselösung auch nicht spurenweise vergor, also „inaktiviert“ war, zeigte auf 9%ige gepufferte Brenztraubensäure ausgezeichnete Einwirkung. (Versuch d.)

Durch Fällung von 400 ccm des so inaktivierten Saftes UM mit 4 l Aceton, Auswaschen mit 1100 ccm wasserfreiem Aceton und nach Trocknung in vacuo wurde dann ein schneeweißes Präparat erhalten, in einer Ausbeute von rund 40 g. Dieses Präparat war noch nach 102 Tagen höchst wirksam. (Versuch e.)

Versuch d.

20 ccm inaktivierter Saft UM wurde mit 20 ccm 8,8%iger Brenztraubensäurelösung (10 ccm 2 m-CH_3.CO.COOH plus 10 ccm 2 m-K_2HPO_4) versetzt. Es trat stürmische Gärung ein. Im Eudiometer wurden bei 37° entwickelt;

nach 10′	. . . . . 2 ccm	CO_2,
„ 30′	. . . . . 4 „	CO_2,
„ 60′	. . . . . 11 „	CO_2.

(Versuch abgebrochen.)

Versuch e.

2 g Acetontrockenpräparat (102 Tage alt[1])), die rund 20 ccm inaktiviertem Saft entsprachen, wurden durch Verreiben in einem Gemisch von 20 ccm Wasser und 20 ccm der bei Versuch d verwendeten 9%igen gepufferten Brenztraubensäurelösung gelöst. Bei 37° wurden entwickelt:

nach 10′	. . . . . 1,5 ccm	CO_2,
„ 30′	. . . . . 3,5 „	CO_2,
„ 60′	. . . . . 9,5 „	CO_2.

(Versuch abgebrochen.)

---

[1]) Anm. bei der Korrektur: Nach 211 Tagen mit gleichem Ergebnis wiederholt.

Der Vergleich der Versuche d und e lehrt, daß durch die Aufbewahrung in trockenem Zustande die von der Hefenzelle getrennte Carboxylase nicht zugrunde geht.

Die hier mitgeteilten neuen Versuche bestätigen unsere alten Erfahrungen über die Beständigkeit der Carboxylase auch nach ihrer Scheidung von der Hefenzelle und nach Überführung in Dauerpräparate.

2. Haltbarkeit der Carboxylase in dialysierten Macerationssäften.

Durch Dialyse verliert nach Beobachtungen von C. Neuberg und P. Rosenthal[1]) Macerationssaft die Fähigkeit nicht, Brenztraubensäure zu zerlegen, während die Zymase vollständig unwirksam wird. Die früher mitgeteilten Versuche waren mit Saft aus Münchener Trockenhefe S angestellt. Wir haben zur Sicherung der Ergebnisse auch die Berliner untergärigen Hefen UM und K herangezogen.

150 ccm Macerationssaft UM und K wurden 48 Stunden bei 0^{0} bis plus 1^{0} gegen Leitungswasser in Gegenwart von Toluol dialysiert. Der nicht dialysierte Anteil war schwach getrübt, ohne daß es zu einer abfiltrierbaren Ausscheidung gekommen war. Das Volumen war durch Einwanderung von Wasser in beiden Fällen auf rund 200 ccm gestiegen. Die dialysierten Säfte vergoren weder Traubenzucker, Fructose noch Rohrzucker, doch wurde letzterer invertiert. Dagegen wurde gepufferte Brenztraubensäure stürmisch, und freie Brenztraubensäure, wenn auch erheblich schwächer, vergoren.

Die dialysierten Säfte enthielten, wie nebenher bemerkt sein möge, nach dem Aufkochen in ganz schwach essigsaurer Lösung und nach Filtration von ausgefallenem Eiweiß sowohl anorganischen als organischen Phosphor. Letzterer ist z. T. wohl in Form von Nucleinsäure oder eines ihrer Spaltungsprodukte vorhanden; denn die auskoagulierten Säfte geben aufs kräftigste die Pentosenreaktionen mit Phloroglucin und Orcin. Wir erwähnen dieses Verhalten wegen der öfter erörterten Beziehungen des dialysablen Ko-Fermentes zu den Phosphorverbindungen. (Siehe S. 138.)

Die kräftige Wirkung der dialysierten Macerationssäfte UM und K auf gepufferte Brenztraubensäure und die schwächere auf freie Brenztraubensäure geht aus folgenden Daten hervor:

---

[1]) C. Neuberg und P. Rosenthal, diese Zeitschr. 51, 141, 1913.

Temp. 28°.

α) 20 ccm dialysierter Saft UM plus 20 ccm mit Phosphat gepufferter 0,88 %iger Brenztraubensäure.

Entw. ccm CO_2 nach . . .	10′	30′	60′	2^h	20^h
	0,5	1,5	2,5	4,5	11,0

β) 20 ccm dialysierter Saft plus 20 ccm 0,88 %ige freie Brenztraubensäure.

Entw. ccm CO_2 nach . . .	10′	30′	60′	2^h	20^h
	0	0	0	0,5	1,5

Temp. 37°.

γ) 15,0 ccm dialysierter Saft K
2,5 „ H_2O
2,5 „ 2 m-Brenztraubensäure.

Entw. ccm CO_2 nach	5′	15′	30′	45′	60′	24^h
	0	0	0	0	0	Spur

δ) 15,0 ccm dialysierter Saft K
2,5 „ 2 m-K_2HPO_4
2,5 „ 2 m-Brenztraubensäure.

Entw. ccm CO_2 nach	5′	15′	20′	45′
	6	11	—	—

3. Haltbarkeit der Carboxylase in ausgegorenen Säften.

Die Wirkung der in Hefesäften enthaltenen Zymase auf Zucker kommt nach einiger Zeit zum Stillstand. Diese sogenannten ausgegorenen Säfte vermögen jedoch Brenztraubensäure noch zu zersetzen. Ja, es zeigte sich, daß bei Gegenwart von gepufferter Brenztraubensäure oder von Pyruvinaten auch vorhandener Zucker noch in die Gärung mit einbezogen werden kann. Diese Beobachtung führte uns dazu, die gemeinsame Vergärung von Zuckerarten und Brenztraubensäure bzw. Pyruvinaten einer Prüfung zu unterziehen (s. S. 75 bis 83), nachdem die Frage der gegenseitigen Beeinflussung schon von anderer Seite (Zaleski, Palladin) aufgeworfen ist. An dieser Stelle seien die hier in Betracht kommenden Daten mitgeteilt:

a) 100 ccm Macerationssaft UM wurden mit 10 g Rohrzucker und 4 ccm Toluol in den Brutschrank gestellt. Als nach 70 Stunden keine Kohlensäureentwicklung mehr nachgewiesen werden konnte, wurden 15 ccm dieser Mischung mit

1,5 g Rohrzucker und 1 ccm Toluol versetzt und 15 Stunden bei 37° in einem Eudiometer aufbewahrt. Es trat nicht die geringste Entwicklung von Kohlensäure mehr ein.

b) 15 ccm desselben ausgegorenen Saftes wurden mit 2,5 ccm 2 m-Brenztraubensäure plus 2,5 ccm 2 m-K_2HPO_4 und 1 ccm Toluol versetzt. Nach 5 Minuten begann eine Entwicklung von Kohlensäure. Bei 37° wurden innerhalb 12 Stunden 5 ccm entwickelt. Der Versuch konnte mit ähnlichem Erfolge mehrmals wiederholt werden.

Die Vergärung der Brenztraubensäure setzt hier, wie ersichtlich, nur langsam ein. Es hat demnach den Anschein, als ob bei der 72stündigen Digestion bei 37°, wobei die Zymase zugrunde geht, auch die Carboxylase leidet. Nun gilt als ein besonders gutes Konservierungsmittel der Gärungsenzyme starke Zuckerlösung. Wir haben deshalb in einem anderen Falle 100 ccm Saft UM mit 60 g Rohrzucker und 4 ccm Toluol versetzt, in der Hoffnung, so die Carboxylase zu konservieren (Saftprobe α). Auffallenderweise trat in diesem Versuch schon nach 12 Stunden völliger Stillstand der Gärung ein. Zum Vergleich waren 100 ccm desselben Saftes UM für sich im Eisschrank mit 4 ccm Toluol aufbewahrt (Saftprobe β). Es wurden nunmehr 10 ccm der gezuckerten Saftprobe α, die reichlich unvergorenen Zucker (Invertzucker) enthielt — nachweisbar nach dem Auskoagulieren des Eiweißes in der Siedehitze — sowie 10 ccm der ungezuckerten Saftprobe β mit je 6 ccm des Gemisches gleicher Teile $^m/_2$-Brenztraubensäure und $^m/_2$-K_2HPO_4-Lösung versetzt. Mit dem neuen Ansatz (α') der Saftprobe α trat eine erheblich stärkere und schnellere Kohlensäureentwicklung ein als mit dem Teil (β') der Saftprobe β.

Es lieferten:

α': ccm CO_2 nach . . .	5′	10′	20′	40′	60′
	1	2,5	6	9	11
β': ccm CO_2 nach . . .	5′	10′	20′	40′	60′
	0,5	1	2	5	7

Da nun die Annahme von vornherein unwahrscheinlich war, daß Zucker ein besseres Konservierungsmittel für Carboxylase sei als Kälte, so wies dieses eigenartige Verhalten darauf hin, daß in die Vergärung der Brenztraubensäure der vorhandene Invertzucker mit hineingezogen sei. Wie sich alsbald

herausgestellt hat (s. S. 83 bis 93), verhalten sich die Homologen der Brenztraubensäure ganz ebenso, und ihre Wirkung erstreckt sich nicht nur auf Rohrzucker, Glucose und Fruchtzucker, sondern auch auf Mannose und Maltose.

In einer anderen Versuchsreihe wurde Saft aus untergäriger Berliner Hefe K (des Instituts für Gärungsgewerbe) verwendet. 100 ccm Saft K wurden mit 10 g Rohrzucker bei 37° belassen. Nach 36 Stunden war keine Gasentwicklung mehr wahrnehmbar.

a) 15 ccm von diesem ausgegorenen Saft wurden mit 1,5 g Rohrzucker versetzt. Nach 15 Stunden: 0 ccm CO_2.

b) 15 ccm desselben ausgegorenen Saftes wurden mit 0,2 ccm freier 2 m-Brenztraubensäure versetzt. Nach 15 Stunden: 1 ccm CO_2.

c) 15 ccm desselben ausgegorenen Saftes plus 0,2 ccm 2 m-Brenztraubensäure plus 0,2 ccm 2 m-K_2HPO_4. Nach 15 Stunden: 4,3 ccm CO_2.

Die Versuche zeigen übereinstimmend die Gegenwart von Carboxylase in ausgegorenen Macerationssäften. Freilich ist ihre Wirksamkeit in manchen Fällen vermindert. Die Resistenz der Carboxylase steht mit der Anschauung (Buchner, Harden) im Einklang, daß die Erschöpfung der Zymase auf der Zerstörung des sogenannten Ko-Fermentes beruht, das für die Tätigkeit der Carboxylase jedoch nicht erforderlich ist.

4. Haltbarkeit der Carboxylase in gelagerten Säften.

a) Saft aus Hefe S wurde unter Zusatz von Toluol 21 Tage lang im Frigo bei einer um 0° herum schwankenden Temperatur aufbewahrt. Der Saft, der zu keiner Zeit gefroren war, blieb völlig klar. Er zeigte keinerlei Einwirkung mehr auf zugefügten Rohr- und Traubenzucker. Dagegen vergor er noch Brenztraubensäure.

15 ccm dieses alten Saftes wurden mit 1 ccm 2 m-Brenztraubensäure und 1 ccm 2 m-K_2HPO_4 versetzt.

Entw. ccm CO_2 nach	1^h	6^h	14^h	24^h
	0,5	2,5	6	9,5

Die Brenztraubensäure wird demnach durch den alten Saft, wenn auch langsam, vergoren. Der Saft enthielt nach 21tägiger

Aufbewahrung noch massenhaft koagulierbares Eiweiß; obgleich die Wirkung der Protease, die man gewöhnlich für die Schädigung der Zymase verantwortlich macht, unter diesen Bedingungen ersichtlich gering ist, war die eigentliche zymatische Wirkung völlig erloschen.

b) Die große Beständigkeit der Carboxylase enthüllt sehr hübsch der folgende Versuch, zu dem ein dialysierter Macerationssaft aus Hefe UM benutzt wurde. Derselbe war 27 Tage im Eisschrank ohne Zusatz eines Antisepticums aufbewahrt; er roch faulig und war von Bakterien getrübt.

I. 8,5 ccm fauliger Saft wurden mit 8,5 ccm mit Phosphat gepufferter m-Brenztraubensäure versetzt. Bei 30° begann sofort Gärung.

Entw. ccm CO_2 nach	1^h	2^h	20^h
	4,5	3	11

II. 8,5 ccm fauliger Saft, 8,5 ccm gepufferte m-Brenztraubensäure, 0,3 ccm 40%iges Formalin; fast sofort trat Gärung ein.

Entw. ccm CO_2 nach	1^h	2^h	20^h
	1,5	2,5	10

III. 8,5 ccm fauliger Saft, 8,5 ccm gepufferte Brenztraubensäure, 0,3 ccm gesättigte Sublimatlösung. Es entsteht eine flockige Fällung, die nicht weiter beachtet wurde. Die Gärung setzt unverzüglich bei 30° ein.

Entw. ccm CO_2 nach	1^h	2^h	20^h
	1,5	2,0	10

Für sämtliche 3 Ansätze konnte konstatiert werden, daß auch bei 12° Gärung eintrat; bei 65° fand in allen 3 Fällen ebenfalls Entwicklung von Kohlendioxyd statt. Vgl. zu den Temperaturgrenzen die Angaben auf S. 11 bis 25.

Es wäre immerhin möglich, daß Bakterien neue Carboxylase gebildet haben. Die Bakterienleiber selbst sind jedoch an den Vorgängen der CO_2-Entwicklung nicht beteiligt; denn filtrierte man die durch das Sublimat erzeugte Fällung ab, so erhielt man ein völlig klares, wasserhelles Filtrat, das noch Brenztraubensäure zerlegte.

Schließlich sei in diesem Zusammenhange darauf hingewiesen, daß nach unseren früheren Beobachtungen[1]) auch

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 56, 497, 1913; C. Neuberg und P. Rosenthal, l. c.

die an Hefezellen gebundene Carboxylase eine große Beständigkeit aufweist.

B. Tätigkeit der Carboxylase bei niederen Temperaturen.

Die Temperaturgrenzen für das Wirkungsbereich der Hefen-Carboxylase fallen nach unseren Ermittlungen fast genau mit denen der Zymase zusammen, wenn man den normalen Vorgang, d. h. die Vergärung mit lebenden Hefen, in Betracht zieht.

Dieses Verhalten bildet ein neues Argument zugunsten der Anschauung, daß die Carboxylase ein Teilenzym des Fermentkomplexes „Zymase“ ist.

Schon früher haben wir an zahlreichen Stellen darauf hingewiesen, daß die Carboxylase ihre charakteristischen Wirkungen bei den üblichen Gärungstemperaturen, bei 28° und bei 37°, äußert. Mehrfach haben wir auch angegeben, daß die Carboxylase bei niederer Temperatur, z. B. Zimmertemperatur von 18°, oder auch bei erhöhter Temperatur, z. B. 51°, tätig ist. Bei weitem die Mehrzahl aller unserer Versuche ist bei Temperaturen unter 39° ausgeführt gewesen; es ist daher einfach unverständlich, wenn Levene und Meyer[1]) behaupten, daß die Carboxylase erst bei 42° zu wirken beginne!

Wir geben im folgenden einige neue Versuche wieder, welche die Wirksamkeit der Carboxylase bei Temperaturen zwischen + 10° und 20° dartun. Zum Vergleich führen wir auch einige Versuche über die Vergärbarkeit des Traubenzuckers und der Fructose unter den gleichen Bedingungen[2]) an.

1. Verhalten der Carboxylase in frischen Hefen.

Temp. 10° bis 12°.

α)	β)
17 ccm 9 %ige Glucoselösung	8,5 ccm 2 m-Brenztraubensäure
1,7 g Hefe U.	8,5 „ 2 m-K_2HPO_4
	1,7 g Hefe U.
Nach 12^h: 11 ccm CO_2.	Nach 12^h: 5 ccm CO_2
	„ 24^h: 11 „ CO_2.

[1]) P. A. Levene und G. M. Meyer, Journ. of Biolog. Chem. 17, 445, 1914.

[2]) Die Zuckerlösung war 9 %ig. Ein Gemisch gleicher Teile 2 m-Dikaliumphosphat und 2 m-Brenztraubensäure ist in bezug auf letztere 8,8 %ig. Die Hefe ist stets zu der frisch bereiteten Mischung gesetzt worden.

γ) 17 ccm 9 %ige Fruchtzuckerlösung
1,7 g Hefe OM.
Nach 12h: 11 ccm CO_2.

δ) 8,5 ccm 2 m-Brenztraubensäure
8,5 „ 2 m-K_2HPO_4
1,7 g Hefe OM.
Nach 12h: 4 ccm CO_2
„ 24h: 9 „ CO_2.

Temp. 15°.

ε) 8,5 ccm m/2-Brenztraubensäure
8,5 „ m/2-K_2HPO_4
1,7 g Hefe XII.
Nach 12h: 3,5 ccm CO_2
„ 24h: 6,0 „ CO_2.

ζ) 8,5 ccm m/2-Brenztraubensäure
8,5 „ m/2-K_2HPO_4
1,7 g Hefe UM.
Nach 12h: 4 ccm CO_2
„ 24h: 7 „ CO_2

Temp. 18° bis 19°.

η) 17 ccm 9 %ige Glucoselösung
1,7 g Hefe U.
Nach 12h: 11 ccm CO_2.

ϑ) 8,5 ccm 2 m-Brenztraubensäure
8,5 „ 2 m-K_2HPO_4
1,7 g Hefe U.
Nach 12h: 6,5 ccm CO_2
„ 24h: 11,0 „ CO_2.

ι) 17 ccm 9 %ige Fructoselösung
1,7 g Hefe OM.
Nach 12h: 11 ccm CO_2.

ϰ) 8,5 ccm 2 m-Brenztraubensäure
8,5 „ 2 m-K_2HPO_4
1,7 g Hefe OM.
Nach 12h: 8 ccm CO_2
„ 24h: 11 „ CO_2.

Diese und andre ähnliche Versuche sind alle in kurzen Eudiometern angesetzt; die Kontrollen auf Selbstgärung sind nicht angeführt, da am Ende keines Versuches die entwickelte Kohlensäuremenge 1 ccm erreichte.

Bei der vielbenutzten Gärungstemperatur von 28° sind einige vergleichende Versuche über die Vergärung von phosphatgepufferter Brenztraubensäure, die 8,8 %ig war, und von 8,8 %iger Fruchtzuckerlösung ausgeführt, die auf den gleichen P_2O_5-Gehalt gebracht war.

Temp. 28°.

λ) 8,5 ccm m-K_2HPO_4

8,5 „ m-KH_2PO_4
1,5 g Fructose
1,7 „ Hefe OM.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	1h	3h
	0,5	1	3	11

μ) 8,5 ccm 2 m-K_2HPO_4
8,5 „ 2 m-Brenztraubensäure
1,7 g Hefe OM.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	1h	3h
	1	1,5	4	11

ν) 8,5 ccm m-K_2HPO_4
8,5 „ m-KH_2PO_4
1,5 g Fructose
1,7 „ Hefe XII.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	1h	3h
	0,75	2,5	5	11

ξ) 8,5 ccm 2 m-K_2HPO_4
8,5 „ 2 m-Brenztraubensäure
1,7 g Hefe XII.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	1h	3h
	0,5	2	4,5	11

Die mitgeteilten Versuche lehren, daß sowohl bei 10° bis 15° als bei 18° bis 19° gepufferte Brenztraubensäure von derselben Konzentration wie eine Hexosenlösung vergoren wird. Allerdings vergären der Frucht- und der Traubenzucker unter diesen Bedingungen etwas schneller; bei 28° bestand kaum ein Unterschied.

2. Verhalten der Carboxylase in Hefenpräparaten.

Fast noch deutlicher als an lebenden Hefen enthüllt sich an Macerationssäften die Aktionsfähigkeit der Carboxylase bei niederen Temperaturen.

Zur Verwendung gelangten Säfte aus getrockneten untergärigen Hefen UM und K sowie aus käuflicher Münchener Trockenhefe S, die sämtlich keine in Betracht kommende Selbstgärung aufwiesen. Es zeigt sich hier auch, daß selbst unter verschiedensten Bedingungen keine wesentlichen Unterschiede in der Zerlegungsstärke von Traubenzucker und gepufferter Brenztraubensäure vorhanden sind.

Temp. 10^0 bis 12^0.

α) 15 ccm Saft UM
1 „ 2 m - Brenztraubensäure
1 „ 2 m-K_2HPO_4.
Beginn der Gärung nach 3 Sek.; sie wird von Minute zu Minute stärker.
Nach 3^h: 3,5 ccm CO_2
„ 24^h: 8,0 „ CO_2
„ 36^h: 11,0 „ CO_2.

β) 15 ccm Saft UM
2 „ 9 $^0/_0$ ige Glucoselösung.
Beginn der Gärung nach 1^h 35′.
Nach 3^h: 1,2 ccm CO_2
„ 24^h: 4,0 „ CO_2
„ 36^h: 6,5 „ CO_2.

Temp. 14^0.

γ) 10 ccm Saft K
4 „ H_2O
1 „ 2 m - Brenztraubensäure
1 „ 2 m-K_2HPO_4.
Nach 15′: 1,0 ccm CO_2
„ 30′: 2,0 „ CO_2
„ 45′: 2,5 „ CO_2
„ 60′: 3,0 „ CO_2
„ 2^h: 5,0 „ CO_2
„ 15^h: 6,0 „ CO_2
„ 24^h: 6,5 „ CO_2.

δ) 10 ccm Saft K
4 „ H_2O
2 „ 9 $^0/_0$ ige Traubenzuckerlösung.
Nach 15′: 1,0 ccm CO_2
„ 30′: 2,0 „ CO_2
„ 45′: 3,0 „ CO_2
„ 60′: 3,5 „ CO_2
„ 2^h: 6,0 „ CO_2
„ 15^h: 7,0 „ CO_2
„ 24^h: 7,0 „ CO_2.

Temp. 16 bis 18^0.

ε) 10 ccm Saft UM
4 „ H_2O
1 „ 2 m - Brenztraubensäure
1 „ 2 m-K_2HPO_4.
Nach 30′: 2 ccm CO_2
„ 45′: 3 „ CO_2
„ 60′: 4 „ CO_2
„ 12^h: 9 „ CO_2.

ζ) 12 ccm Saft S
2 „ 2 m - Brenztraubensäure
2 „ 2 m-K_2HPO_4.
Gärt deutlich nach 3′.
Nach 30′: 4 ccm CO_2
„ 45′: 6 „ CO_3
„ 60′: 7 „ CO_2
„ 12^h: 11 „ CO_2.
(Nach 20^h noch völlig klar.)

η) 16,0 ccm Saft S
0,14 „ wasserfreie Brenztraubensäure.

Sofort Niederschlag. Gärt nach 1ʰ noch nicht.
Nach 12ʰ: 1,5 ccm CO_2
„ 15ʰ: 2,0 „ CO_2.

Die beiden letzten Versuche zeigen zugleich sehr schön die Beeinträchtigung der Carboxylasewirkung durch freie Brenztraubensäure (vgl. S. 70 bis 75). Daß auch gelagerter Saft bei 12⁰ wirkt, wurde schon S. 10 angeführt.

Die Hefencarboxylase wirkt nun bei niederen Temperaturen nicht nur auf die Brenztraubensäure, sondern auch auf andere Ketosäuren, so auf die Oxalessigsäure, die α-Ketobuttersäure und die Methyl-äthyl-brenztraubensäure; andere Ketosäuren sind nach dieser Richtung nicht geprüft.

Temp. 14⁰.

η) 10 ccm Saft K
2 „ H_2O
4 „ m/2-Oxalessigsäure.

Entw. ccm CO_2 nach . . .	15′	30′	45′	60′	2ʰ
	1	2	3	4	11

ϑ) 10 ccm Saft K
2 „ H_2O
4 „ m/2-Methyläthylbrenztraubensäure.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′	15ʰ	24ʰ
	1	2	3,5	5,5	7	9

Diese Gärung der α-Ketocapronsäure setzte geradezu stürmisch ein.

Temp. 16 bis 18⁰.

ι) 12 ccm Saft S
(starke Ausflockung)
4 „ m/2-Oxalessigsäure.

Entw. ccm CO_2 nach	10′	30′	12ʰ
	6	8	11

κ) 13 ccm Saft S
(kräftige Ausflockung)
2 „ m-α-Ketobuttersäure.

Entw. ccm CO_2 nach	10′	30′	12ʰ
	1	7	10

Temp. 28°.

λ) 10 ccm Saft UM
4 " H_2O
2 " m-α-Ketobuttersäure.

Entw. ccm CO_2 nach . . .	15′	30′	45′	60′	2h
	0,5	1	2	4	11

μ) 10 ccm Saft UM
4 " H_2O
2 " m/2-Methyläthylbrenztraubensäure.

Entw. ccm CO_2 nach . . .	15′	30′	45′	60′	2h
	0,75	1	2	4	5,5

C. Tätigkeit der Carboxylase bei hohen Temperaturen.

Als unterste Temperaturgrenze, bei der wir Carboxylase noch wirksam fanden, kann vorläufig + 10° gelten; wahrscheinlich liegt das Minimum noch etwas tiefer. Als oberste Grenze haben wir rund + 70° ermittelt. Das gilt für frische Hefen, während für Hefenpräparate[1]) (Säfte und Trockenpräparate) die kritische Temperatur zwischen 65 und 68° liegt.

Die Tatsache, daß sich die Breite der Fermentwirkung über 60° erstreckt, ist gewiß bemerkenswert. Die Reaktionsprodukte sind nach Untersuchungen an der Brenztraubensäure im ganzen Temperaturbereiche qualitativ die gleichen.

Angenähert parallel mit der Tätigkeit der Carboxylase bei hohen Temperaturen geht auch die Wirksamkeit der Zymase. Das trifft jedoch nur für frische Hefen zu. Bei der zellfreien Gärung ist die Zymase viel weniger widerstandsfähig, sie erlosch bei unseren Macerationssäften schon gegen 51°.

1. Verhalten der Carboxylase in frischen Hefen.

Zunächst wählten wir als Gärungstemperatur für die frischen Hefen die Zone, in der die „Zymase" in Macerationssäften zugrunde geht, nämlich 50 bis 52°.

Die folgenden Versuche sind in Schrötterschen Gärungsröhrchen von 12 ccm Kapazität angestellt; diese befanden sich in einem als Thermostat dienenden großen Jenenser Becherglase. Die angegebenen Temperaturen sind stets die im Inneren

[1]) Vgl. hierzu die Angaben S. 22 bis 25.

der Gärröhrchen herrschenden. Sie wurden an einem Thermometer abgelesen, das durch ein mit dem offenen Schenkel verbundenes Glasrohr eingeführt wurde.

Da mit der Möglichkeit gerechnet werden mußte, daß die extrem hohe Temperatur in Gegenwart von Phosphat eine abnorme Steigerung der Selbstgärung bedingen möchte, so ist hier und in den folgenden Fällen der Umfang der Eigengärung in Gegenwart der gleichen PO_4-Rest-Konzentration besonders ermittelt; es zeigte sich, daß sie in allen Fällen vernachlässigt werden kann, wenigstens für unsere Versuchszeiten.

Temp. 50 bis 52°.

α) 8,5 ccm 2 m-Brenztraubensäure
8,5 „ 2 m-K_2HPO_4
1,7 g Hefe OM.

Entw. ccm CO_2 nach	30′	45′	60′
	5	8,5	11

Kontrolle auf Selbstgärung der Hefe OM.

β) 8,5 ccm m-K_2HPO_4
8,5 „ m-KH_2PO_4
1,7 g Hefe OM.

Entw. ccm CO_2 nach	30′	45′	60′
	0	0	0,25

γ) 8,5 ccm 2 m-Brenztraubensäure
8,5 „ 2 m-K_2HPO_4
1,7 g Hefe XII.

Entw. ccm CO_2 nach	30′	45′	60′
	6	9	11

Kontrolle auf Selbstgärung der Hefe XII.

δ) 8,5 ccm m-K_2HPO_4
8,5 „ m-KH_2PO_4
1,7 g Hefe XII.

Entw. ccm CO_2 nach	30′	45′	60′
	0	0	Spur

ε) 8,5 ccm 2 m-Brenztraubensäure
8,5 „ 2 m-K_2HPO_4
1,7 g Hefe K.

Entw. ccm CO_2 nach	5′	10′	20′
	2	6	11

Kontrolle auf Selbstgärung der Hefe K.

ζ) 8,5 ccm m-K_2HPO_4
8,5 „ m-KH_2PO_4
1,7 g Hefe K.

Entw. ccm CO_2 nach	5′	10′	20′	60′
	0	0	0	0

Zum Vergleich seien nun einige Versuche über die Vergärung von Traubenzucker, Fructose und Saccharose durch die Hefe OM bei 50 bis 52° mitgeteilt, die ein Jahr später vorgenommen wurden.

η) 8,5 ccm 2 m-Brenztraubensäure
8,5 „ 2 m-K_2HPO_4
1,7 g Hefe OM.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′
	3,5	6	10

ϑ) 17,0 ccm H_2O
0,75 ccm fester Traubenzucker
1,7 g Hefe OM.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′
	1,5	5	8

ι) 17,0 ccm H_2O
0,75 ccm fester Fruchtzucker
1,7 g Hefe OM.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′
	4	8	11

κ) 17,0 ccm H_2O
0,75 g Rohrzucker
1,7 g Hefe OM.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′
	3	7	11

Wie man sieht, gärt die Brenztraubensäure besser als der Traubenzucker; die Fructose wird aber auch unter diesen ungewöhnlichen Bedingungen am leichtesten umgesetzt.

Entsprechende Versuche wurden alsdann bei einer rund 10° höheren Temperatur ausgeführt.

Temp. 60 bis 61°.

α) 8,5 ccm 2 m-Brenztraubensäure
8,5 „ 2 m-K_2HPO_4
1,7 g Hefe OM.

Entw. ccm CO_2 nach 15′ : 11.

Kontrolle auf Selbstgärung der Hefe OM.

β) 8,5 ccm m-K_2HPO_4
8,5 „ m-KH_2PO_4
1,7 g Hefe OM.

Entw. ccm CO_2 nach 15′ : 0.

γ) 8,5 ccm 2 m-Brenztraubensäure
8,5 „ 2 m-K_2HPO_4
1,7 g Hefe XII.

Entw. ccm CO_2 nach 15′ : 11.

Kontrolle auf Selbstgärung der Hefe XII.

δ) 8,5 ccm m-K_2HPO_4
8,5 „ m-KH_2PO_4
1,7 g Hefe XII.

Entw. ccm CO_2 nach 15′ : 0.

ε) 8,5 ccm 2 m-Brenztraubensäure
8,5 „ 2 m-K_2HPO_4
1,7 g Hefe K.

Entw. ccm CO_2 nach 10′ : 11.

Kontrolle auf Selbstgärung der Hefe K.

ζ) 8,5 ccm m-K_2HPO_4
8,5 „ m-KH_2PO_4
1,7 g Hefe K.

Entw. ccm CO_2 nach 10′ : 0, nach 1^h : 0.

Die mitgeteilten Daten lehren, daß mit einer Steigerung der Temperatur die Carboxylase schneller wirkt. Offenbar ist die Carboxylase bei 60 bis 61° noch sehr wirksam.

Das Bild ändert sich jedoch bei einer weiteren Erhöhung der Temperatur um 5°; bei 65 bis 66° läßt die Tätigkeit der Carboxylase erheblich nach und zugleich ist auch die Zymasewirkung der betreffenden Hefen fast erloschen.

Temp. 65 bis 66°.

α) 8,5 ccm 2 m-Brenztraubensäure
8,5 „ 2 m-K_2HPO_4
1,7 g Hefe OM.

Entw. ccm CO_2 nach	1^h	6^h	8^h	16^h
	3	4,5	4,5	4,5

Kontrolle der Hefe OM auf Selbstgärung.

β) 8,5 ccm m-K_2HPO_4
8,5 " m-KH_2PO_4
1,7 g Hefe OM.

Entw. ccm CO_2 nach	1h	6h	8h	16h
	0	0	Spur	Spur

γ) 17,0 ccm 9% ige Traubenzuckerlösung
1,7 g Hefe OM.[1])

Entw. ccm CO_2 nach	1h	6h	8h	16h
	0	0,5	0,75	1,5

δ) 8,5 ccm 2 m-Brenztraubensäure
8,5 " 2 m-K_2HPO_4
1,7 g Hefe U.

Entw. ccm CO_2 nach	1h	6h	8h	16h
	1,5	3,0	3,0	3,0

Kontrolle der Hefe U auf Selbstgärung.

ε) 8,5 ccm m-K_2HPO_4
8,5 " m-KH_2PO_4
1,7 g Hefe U.

Entw. ccm CO_2 nach	1h	6h	8h	16h
	0	0	Spur	0,25

ζ) 17,0 ccm 9% ige Traubenzuckerlösung
1,7 g Hefe U.

Entw. ccm CO_2 nach	1h	6h	8h	16h
	0	0,5	0,5	1,25

Die Abschwächung[1]) bzw. die Aufhebung der Gärwirkung bei 65 bis 66° ist nicht völlig scharf. In einigen Versuchen mit ganz frischer und sehr gärkräftiger Hefe XII und U haben wir gelegentlich eine stärkere Entwicklung von CO_2 beobachten können und zwar bis zu Temperaturen von 69°; die Vergärung

[1]) Bei einer Wiederholung dieses Versuches mit derselben Hefe OM 1 Jahr später erwies sich die Hefe als viel kräftiger. Unter gleichen Bedingungen waren die Werte:

nach	15′	30′	60′
für gepufferte Brenztraubensäure	4,5	9	10
" d-Glucose	3,5	6	7,5
" d-Fructose	4	8	9,5

des Traubenzuckers blieb jedoch stets hinter der der Brenztraubensäure zurück.

Über die Wirksamkeit gelagerten Saftes bei 65° siehe die Angabe auf S. 10).

Temp. 71 bis 72°.

α) 8,5 ccm 2 m-Brenztraubensäure
8,5 „ 2 m-K_2HPO_4
1,7 g Hefe OM.

Während des Anwachsens der Innentemperatur trat natürlich Gasentwicklung ein. Bei 70 bis 71° stiegen 30 Minuten lang noch vereinzelte Bläschen auf, von einer Gärung war jedoch keine Rede mehr.

β) 8,5 ccm 2 m-Brenztraubensäure
8,5 „ 2 m-K_2HPO_4
1,7 g Hefe XII.

Das Verhalten war genau wie beim voraufgehenden Versuch. Steigert man die Temp. auf 72°, so hört auch die spärliche Entwicklung kleiner CO_2-Blasen alsbald auf.

Diese Versuche sind wiederholt mit dem gleichen Ergebnis ausgeführt. Nur 2 mal erwies sich die Hefe UM als sehr viel resistenter, indem sie bei 80° noch beträchtlich, bei 90° noch wahrnehmbar sowohl Fruchtzucker wie gepufferte Brenztraubensäure (unter obigen Bedingungen) zerlegte. Bei 98° war jede Wirkung auch hier erloschen. Bemerkenswerterweise gingen in diesem Ausnahmefall Carboxylase- und Zymasetätigkeit ebenfalls vollkommen parallel.

Schließlich seien noch einige Versuche mit je zwei obergärigen Hefen und einer Unterhefe angeführt, die vor Zugabe der Substrate 30 Minuten lang auf 55° erhitzt gewesen waren. Die Göransätze wurden sodann bei 37° vorgenommen.

Je 50 g Hefe OM, XII und U wurden mit 50 ccm Leitungswasser zu einer gleichmäßigen Suspension angerührt und dann $^1/_2$ Stunde auf 55° erwärmt.

1. 5 ccm 2 m-Brenztraubensäure
5 „ 2 m-K_2HPO_4
5 „ Hefensuspension OM.

Beginnt bei 37° nach 30′ zu gären; nach 12^h : 11 ccm CO_2.

2. 10 ccm 9 % ige Glucoselösung
5 „ Hefensuspension OM.
Gärt nach 30′ nicht; nach 12h: 6 ccm CO_2.
3. 5 ccm 2 m-Brenztraubensäure
5 „ 2 m-K_2HPO_4
5 „ Hefensuspension XII.
Nach 30′: 0; nach 12h: 11 ccm PO_2.
4. 10 ccm 9 % ige Glucoselösung
5 „ Hefensuspension XII.
Nach 30′: 0; nach 12h: 9 ccm CO_2.

Die untergärige Hefe U zeigte hier nach gleicher Vorbehandlung keinerlei Wirksamkeit mehr, weder gegen gepufferte Brenztraubensäure noch gegen Traubenzucker.

Jedenfalls kann Carboxylase in vorher auf 55° erwärmten frischen Oberhefen noch vorhanden sein.

2. Verhalten der Carboxylase in Hefepräparaten.

Schon früher haben C. Neuberg und P. Rosenthal[1]) angegeben, daß durch Erhitzen auf 50 bis 51° gärkräftige Macerationssäfte derartig verändert werden, daß die Zymasetätigkeit erloschen ist, während die Carboxylase noch wirkt. Diese Erscheinung ist jetzt einer genaueren Untersuchung unterzogen worden. Die Inaktivierung der Zymase kann bei Temperaturen zwischen 50 und 65° erfolgen. Bei 70° findet völlige Zerstörung statt, bei 65° wird die Carboxylase schon recht deutlich geschwächt. Wie früher konnten wir auch jetzt feststellen, daß die Carboxylase bei den Temperaturen der Zymaseinaktivierung noch wirksam ist. Über die Einzelheiten geben die folgenden Daten Aufschluß:

Temp. 54°.

175 ccm Saft UM wurden 35 Minuten lang im konstanten Wasserbade auf 54° erhitzt. Dann wurde vom Koagulum abfiltriert. Das klare hellgelbe Filtrat enthielt noch in der Siedehitze gerinnendes und durch Säuren ausfällbares Eiweiß.

a) 14 ccm dieses inaktivierten Saftes,
1 „ 2 m-Brenztraubensäure,
1 „ 2 m-K_2HPO_4.

[1]) l. c.

Die klare Lösung[1]) beginnt schon in der Kälte (+ 10 bis 12°) nach 1 Minute zu gären.

Entw. ccm CO_2 nach	3^h	24^h	49^h
	1,5	4,75	10,5

Die Schwächung der Carboxylase durch die vorangegangene Erwärmung auf 54° ist nicht sehr erheblich. Das lehrt der Vergleich mit Versuch α des Abschnittes B. 2 (S. 14), der mit demselben Macerationssaft UM im nativen Zustande angestellt worden ist.

b) Nach Zusatz von 2 ccm 9%iger Traubenzuckerlösung zu 14 ccm des inaktivierten Saftes UM trat weder in der Kälte, noch bei 28° oder 37° Gärung ein, ebensowenig wurde Rohrzucker vergoren, obgleich Inversion erfolgt war[2]).

c) Ein weiterer Brenztraubensäureversuch mit einem zu anderer Zeit dargestellten inaktivierten Saft UM ist unter d im Abschnitt A. 1 (S. 5) beschrieben.

d) Der bei 54° vorbehandelte Saft UM vergor auch bei 54° gepufferte Brenztraubensäure.

Temp. 60°.

200 ccm Macerationssaft K wurden 5 Minuten auf 60° gehalten und dann filtriert.

e) Das klare Filtrat verhielt sich wie der Saft des Versuches a. Außerdem wurde noch festgestellt, daß die gepufferte, aber nicht die freie Brenztraubensäure bei 60° kräftig vergor, wobei im ersten Fall das Gemisch anfangs klar blieb, sich innerhalb 3 Stunden aber wieder trübte. (Neue Wärmekoagulation von Eiweiß.)

Temp. 61°.

200 ccm Macerationssaft aus käuflicher Trockenhefe nach von Lebedew wurden 5 Minuten bei 61° inaktiviert und filtriert.

f) 13 ccm Filtrat,
2 " 2m-Brenztraubensäure,
2 " 2m-K_2HPO_4.

Entw. ccm CO_2 bei 37° nach	15′	30′	45′	60′
	1,5	5	8	11

[1]) Auch auf Zusatz von 2 ccm freier m-Brenztraubensäure tritt eine, wenn auch schwächere Gärung ein. Nach 48 Stunden waren 5,5 ccm CO_2 aus dem stark getrübten Gemisch entwickelt.

[2]) Daraus folgt, daß eine wäßrige Invertinlösung, die Eiweiß enthält, länger als $^1/_2$ Stunde auf 54° erhitzt werden kann, ohne daß die Invertase zerstört wird.

g) 12 ccm desselben Filtrats,
0,5 " freie 2 m-Brenztraubensäure.

Es erfolgt Trübung, die sich alsbald zu Flocken verdichtet.

Entw. ccm CO_2 bei 37° nach	15′	30′	45′	60′	14^h
	0,75	1,75	2	4	7

Temp. 65° bis 68°.

200 ccm Saft S wurden 5 Minuten bei 65° bis 68° gehalten. Das klare Filtrat des entstandenen Koagulums enthielt noch ausfällbares Eiweiß.

h) 12 ccm Filtrat,
2 " 2 m-Brenztraubensäure,
2 " 2 m-K_2HPO_4.

Entw. ccm CO_2 bei 37° nach	1^h	2^h	15^h
	0	1	10

i) 16 ccm desselben Filtrats,
0,5 " freie 2 m-Brenztraubensäure.

Entw. ccm CO_2 bei 28° nach	1^h	2^h	16^h
	0	0	8

Temp. 70°.

Je 200 ccm Saft UM wurden einmal 5 Minuten, dann 3,5 Minuten und schließlich 2 Minuten auf 70° erhitzt. Keine der filtrierten Saftproben, die sämtlich noch koagulables Eiweiß enthielten, war imstande, freie oder gepufferte Brenztraubensäure innerhalb 36 Stunden zu zerlegen.

Es verdient hervorgehoben zu werden, daß die obere Temperaturgrenze der Carboxylase gleich gefunden wird, einerlei, ob die Prüfung mit frischem Hefenmaterial oder Macerationssäften erfolgt.

Diesen Produkten schließen sich im Verhalten die Trockenhefen selbst an, die in ihren Eigenschaften gewissermaßen in der Mitte zwischen frischem und zellfreiem Material stehen.

Untersucht wurden die beiden Trockenhefen UM und K, die auch zur Bereitung der mehrfach erwähnten Macerationssäfte dienten. Es wurde festgestellt, daß beide bei 60 bis 61° goren.

Temp. 60 bis 61°.

k) 8,5 ccm 2 m-Brenztraubensäure,
8,5 " 2 m-K_2HPO_4,
1,0 g Trockenhefe K.

Beginnt sofort zu gären. Nach 15 Minuten 10 ccm CO_2.

l) 8,5 ccm 2 m-Brenztraubensäure,
8,5 „ 2 m-K_2HPO_4.
1,0 g Trockenhefe UM.

Gärt alsbald; nach 15 Minuten 1 ccm CO_2, nach 60 Minuten 3,5 ccm entwickelt.

Temp. 65°.

In gleicher Weise wurde die Wirksamkeit von Carboxylase in Trockenhefen bei 65° festgestellt.

Die Trockenhefen UM und K ließen zugleich eine, wenn auch schwache Einwirkung auf Traubenzucker bei 65° erkennen. Die Prüfung geschah durch Einwirkung von 1 g der Trockenhefe auf je 17 ccm 9%ige Glucoselösung bzw. auf mit Phosphat gepufferte m-Brenztraubensäuremischung.

D. Wirkung von Zusätzen auf die Carboxylase.

1. Einfluß von Pufferungsgemischen.

Von den Wirkungen der Carboxylase ist die auf Brenztraubensäure von uns am häufigsten untersucht, da diese Säure die nächsten Beziehungen zu den Vorgängen der alkoholischen Gärung haben dürfte. Wiederholt konnten wir darauf hinweisen, daß die Umsetzung der freien Brenztraubensäure angesichts der großen Stärke dieser Säure besonders merkwürdig ist; es hat fast den Anschein[1]), als ob eine gewisse Anpassung der Hefe an die Brenztraubensäure vorhanden sei. Die kräftige Säurenatur der Brenztraubensäure macht sich naturgemäß am meisten geltend, wenn sie mit empfindlichen Fermentpräparaten in Berührung kommt. Dies gilt insbesondere für die sogenannten Macerationssäfte, in denen die Brenztraubensäure wie jede andere Säure Eiweißniederschläge erzeugt[2]). Wir sind deshalb

---

[1]) Vgl. hierzu C. Neuberg und L. Czapski, diese Zeitschr. 67, 51, 1914.

[2]) Die gegenteilige Angabe von M. Oppenheimer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 93, 256, 1914, entspricht nicht den Tatsachen und steht im Widerspruche zu allen Erfahrungen über die Säurefällung der Proteine. Daß Säuren ganz allgemein Hefensäfte fällen, ist seit den Untersuchungen von Buchner (Zymasegärung, S. 72) eine bekannte Tatsache. Buchner gibt ferner (l. c. S. 145) an, daß schon der Zusatz von 0,1% Weinsäure sogleich eine Ausfällung bewirkt und die Gärkraft vernichtet. Einige Male, wo wir Preßsaft und Macerations-

schon früher darauf bedacht gewesen, die Säurewirkung der Brenztraubensäure auf eiweißhaltige Carboxylase-Säfte zu mildern, bzw. aufzuheben. Zu diesem Zwecke bedienten wir[1]) uns der Pufferungssysteme im Sinne von Sörensen und haben Phosphate, Arsenite und Borate mit Erfolg benutzt. Gleichzeitig mit uns hat auch Harden[2]) zum Studium der Carboxylase die Anwendung der Phosphatpufferung empfohlen und bewährt gefunden und W. Zaleski[3]) hat in Übereinstimmung mit uns gezeigt, daß die Carboxylase höherer Pflanzen oft auf freie Brenztraubensäure nicht mehr einwirkt und jedenfalls die Salze besser zerlegt.

Eine weitere Bestätigung unsrer Angaben über den Nutzen der Pufferung haben neuerdings W. Palladin, N. Gromoff u. N. N. Monteverde[4]) geliefert.

Es ist klar, daß die Rolle der Pufferungssysteme bei der Benutzung lebender Hefen nicht so wichtig ist, da hier der gesamte Zellinhalt einen Vorrat an natürlichen Moderatoren[5]) darstellt. Da je nach den Ernährungs- und Züchtungsbedingungen das Milieu der Hefen ein wenig schwankt, so könnte es unter günstigen Bedingungen theoretisch vorkommen, daß ein besonderer Zusatz von Pufferungsmitteln keinen wesentlichen Einfluß auf die Brenztraubensäuregärung erkennen ließe. Wir haben bei der mehrjährigen Beschäftigung mit diesem Gegenstande einen ausgesprochenen Fall dieser Art allerdings nicht erlebt; wir teilen im folgenden eine Reihe vergleichender Untersuchungen über die Vergärung gepufferter

saft vergleichen konnten, erwies sich letzterer durch gleiche Säuremengen stärker koagulierbar. — Selbst saure Salze erzeugen Gerinnsel (Buchner und Klatte, diese Zeitschr. 8, 533, 1908. — Vgl. auch Meisenheimer Gamberjan und Semper, diese Zeitschr. 54, 109, 1913.) Die Angaben von M. Oppenheimer werden ferner durch die Feststellungen aller im folgenden erwähnten Autoren widerlegt.

1) C. Neuberg und P. Rosenthal, diese Zeitschr. 51, 132, 1913; Chem. Centralbl. 13, II, S. 57.

2) A. Harden, Chem. Centralbl. 18, II, 1888.

3) W. Zaleski, Diese Zeitschr. 47, 185, 1912; 48, 175, 1913; Ber. d. dtsch. botan. Ges. 31, 353, 1913.

4) W. Palladin, N. Gromoff u. N. N. Monteverde, Diese Zeitschr. 62, 140, 1914.

5) Im Sinne von K. Spiro u. M. Koppel, Diese Zeitschr. 65, 409, 1914.

und nichtgepufferter Brenztraubensäure mit, die ausnahmslos die auffällige Wirkung der Moderatoren dartun[1]).

Zunächst seien einige abgekürzte Versuche mitgeteilt, d. h. solche, die Vergleichsbestimmungen in Schrötterschen Gärröhren mit Quecksilberverschluß sind. Die Prüfung geschah mit frischen Hefen und Macerationssäften, gelegentlich auch mit einigen Trockenhefen.

I. Wirkung von Pufferungsgemischen bei frischen Hefen.

Temp. 37°.

α) 13,5 ccm H_2O
1,5 „ 2 m-Brenztraubensäure
1 g Hefe UM.

Entw. ccm CO_2 nach	1h	14h
	0,2	2,3

β) 12,0 ccm H_2O
1,5 „ 2 m-Brenztraubensäure
1,5 „ 2 m-K_2HPO_4
1 g Hefe UM.

Entw. ccm CO_2 nach	1h	14h
	0,5	5

γ) 10 ccm H_2O
5 „ 2 m-Brenztraubensäure
1 g Hefe UM.

Entw. ccm CO_2 nach	1h	14h
	0,25	1,3

δ) 5 ccm H_2O
5 „ 2 m-Brenztraubensäure
5 „ 2 m-K_2HPO_4
1 g Hefe UM.

Entw. ccm CO_2 nach	1h	14h
	0,6	11

[1]) Anm. bei der Korr. Auch A. Bau (Wochenschr. f. Brauerei 32, 153, 1915) hat jüngst mitgeteilt, daß durch seine Trockenhefen freie Brenztraubensäure nicht angegriffen wurde, während Pyruvinate unter dem Einfluß der natürlichen Puffer der Hefen (saurer Phosphate) zerlegt wurden.

ε) 10 ccm H_2O
5 " 2 m-Brenztraubensäure
1 g Hefe OM.

Entw. ccm CO_2 nach	2^h	4^h	6^h	24^h
	0	Spur	Spur	Spur

ζ) 5 ccm H_2O
5 " 2 m-K_2HPO_4
5 " 2 m-Brenztraubensäure
1 g Hefe OM.

Entw. ccm CO_2 nach	2^h	4^h	6^h	24^h
	6	8	11	—

η) 10 ccm H_2O
5 " 2 m-Brenztraubensäure
1 g Hefe XII.

Entw. ccm CO_2 nach	2^h	4^h	6^h	24^h
	0,5	0,5	0,75	1,75

ϑ) 5 ccm H_2O
5 " 2 m-K_2HPO_4
5 " 2 m-Brenztraubensäure
1 g Hefe XII.

Entw. ccm CO_2 nach	2^h	4^h	6^h	24^h
	3	5	8	11

ι) 10 ccm H_2O
5 " 2 m-Brenztraubensäure
1 g Hefe K.

Entw. ccm CO_2 nach	2^h	4^h	6^h	24^h
	0	0	1	1,5

$\varkappa$) 5 ccm H_2O
5 " 2 m-K_2HPO_4
5 " 2 m-Brenztraubensäure
1 g Hefe K.

Entw. ccm CO_2 nach	2^h	4^h	6^h	24^h
	3	5,5	6,5	11

λ) 10 ccm H_2O
5 „ 2 m-Brenztraubensäure
1 g Hefe K.

Entw. ccm CO_2 nach	2^h	3^h	5^h	22^h
	0	0	0	2

μ) 10 ccm $^m/_2$-$Na_2B_4O_7$ (warm gemischt mit)
5 „ 2 m-Brenztraubensäure
1 g Hefe K.

Entw. ccm CO_2 nach	2^h	3^h	5^h	22^h
	2	4	5	11

Temp. 28°.

α) 10 ccm H_2O
5 „ 2 m-Brenztraubensäure
1 g Hefe OM.

Entw. ccm CO_2 nach	2^h	4^h	6^h	24^h
	0	Spur	Spur	0,5

β) 5 ccm H_2O
5 „ 2 m-K_2HPO_4
5 „ 2 m-Brenztraubensäure
1 g Hefe OM.

Entw. ccm CO_2 nach	2^h	4^h	6^h	24^h
	2	2,5	4,5	11

γ) 10 ccm H_2O
5 „ 2 m-Brenztraubensäure
1 g Hefe UM.

Entw. ccm CO_2 nach	2^h	4^h	6^h	24^h
	0	0	0,5	1,5

δ) 5 ccm H_2O
5 „ 2 m-K_2HPO_4
5 „ 2 m-Brenztraubensäure
1 g Hefe UM.

Entw. ccm CO_2 nach	2^h	4^h	6^h	24^h
	2	3	4,5	11

ε) 10 ccm H_2O
5 „ 2 m-Brenztraubensäure
1 g Hefe XII.

Entw. ccm CO_2 nach	2^h	4^h	6^h	24^h
	0,5	0,5	0,75	2,5

ζ) 5 ccm H_2O
5 „ 2 m-K_2HPO_4
5 „ 2 m-Brenztraubensäure
1 g Hefe XII.

Entw. ccm CO_2 nach	2^h	4^h	6^h	24^h
	2,5	4	5	11

η) 10 ccm H_2O
5 „ 2 m-Brenztraubensäure
1 g Hefe K.

Entw. ccm CO_2 nach	2^h	4^h
	0	Spur

ϑ) 5 ccm H_2O
5 „ 2 m-K_2HPO_4
5 „ 2 m-Brenztraubensäure
1 g Hefe K.

Entw. ccm CO_2 nach	2^h	4^h
	6	11

ι) 10 ccm H_2O
5 „ 2 m-Brenztraubensäure
1 g Hefe K.

Entw. ccm CO_2 nach	2^h	4^h	6^h	12^h
	0	Spur	0,5	1

κ) 5 ccm H_2O.
10 „ $^m/_2$-$Na_2B_4O_7$ (warm gemischt mit)
5 „ 2 m-Brenztraubensäure
1 g Hefe K.

Entw. ccm CO_2 nach	2^h	4^h	6^h	12^h
	1	1,5	2	8

λ) 8,5 ccm 2 m-Brenztraubensäure
8,5 „ H_2O
1 g Hefe OM.

Entw. ccm CO_2 nach 1^h: 0.

μ) 8,5 ccm 2 m-Brenztraubensäure
8,5 „ 2 m-KH_2BO_3
1 g Hefe OM.

Entw. ccm CO_2 nach 1^h: 11 ccm.

ν) 8,5 ccm 2 m-Brenztraubensäure
8,5 „ H_2O
1 g Hefe U.

Entw. ccm CO_2 nach	1^h	2^h	$2,5^h$
	0	0,5	0,75

ξ) 8,5 ccm 2 m-Brenztraubensäure
8,5 „ 2 m-KH_2BO_3
1 g Hefe U.

Entw. ccm CO_2 nach	1^h	2^h	$2,5^h$
	5	8,5	11

II. Wirkung von Pufferungsgemischen bei Macerationssäften.

Temp. 37°.

α) 15,0 ccm Saft S
1,5 „ H_2O
1,5 „ 2 m-Brenztraubensäure.

Es erfolgt vollständige Gelatinierung.

β) 15,0 ccm Saft S
1,5 „ 2 m-K_2HPO_4
1,5 „ 2 m-Brenztraubensäure.

Die Mischung bleibt völlig klar.

Entw. ccm CO_2 nach	5′	10′	15′
	6,5	9	11

γ) 7,5 ccm Saft S
7,5 „ m/10-$Na_2B_4O_7$
0,75 „ 2 m-Brenztraubensäure.

Entw. ccm CO_2 nach	10′	30′	45′	60′	15^h	24^h
	0,25	0,5	0,75	0,8	3,5	5

δ) 15,0 ccm Saft S
1,5 „ 2 m-K_2HAsO_3
1,5 „ 2 m-Brenztraubensäure.

Entw. ccm CO_2 nach . . .	5′	10′	15′	20′	1^h
	4,75	6,5	7	7,5	8,5

ε) 16,0 ccm Saft UM
0,14 „ wasserfreie Brenztraubensäure (= 0,178 g).

Gärt nach 6″.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60
	2	4	5,5	6,5

ζ) 12 ccm Saft UM
2 „ 2 m-Brenztraubensäure
2 ccm 2 m-K_2HPO_4

Gärt nach 4″ stark.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	3,5	6,5	9	11

η) Zum Vergleich sei ein Versuch mit Rohrzucker angeführt, der gleichzeitig angestellt wurde.

16,0 ccm Saft UM
1,8 g Rohrzucker.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	0	0	1	4

Die Säfte S und UM zeigten, wie nochmals ausdrücklich betont sei, innerhalb 36 Stunden keine merkliche Selbstgärung. Temp. 28°.

α) 15,0 ccm Saft S
1,5 „ 2 m-Brenztraubensäure.

Es trat vollständige Koagulation ein.

β) 15,0 ccm Saft S
1,5 „ 2 m-K_2HPO_4
1,5 „ 2 m-Brenztraubensäure.

Entw. ccm CO_2 nach	5′	10′	15′	30′
	3,5	6,5	8	11

γ) 7,5 ccm Saft S
7,5 „ $^m/_{10}$-$Na_2B_4O_7$
0,75 „ 2 m-Brenztraubensäure.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′	15^h	24^h
	0,5	0,6	0,8	1	3,0	5,5

δ) 15,0 ccm Saft S
1,5 „ 2 m-K_2HAsO_3
1,5 „ 2 m-Brenztraubensäure.

Entw. ccm CO_2 nach . . .	15′	30′	45′	60′	15[h]
	0,5	2	2,5	3	6,5

ε) 14 ccm Saft UM
1 „ H_2O
1 „ 2 m-Brenztraubensäure.

Es trat starke Fällung ein, doch war der Versuch durchführbar.

Entw. ccm CO_2 nach . . .	15′	30′	45′	60′	2[h]
	0	0,5	1	5	10

ζ) 14 ccm Saft UM
1 „ 2 m-K_2HPO_4
1 „ 2 m-Brenztraubensäure.

Entw. ccm CO_2 nach . . .	15′	30′	45′	60′	2[h]
	3	5,5	7	11	—

Von der Wiedergabe weiterer Versuche, die alle gleichsinnig verliefen, kann abgesehen werden. Es sei aber darauf hingewiesen, daß sich die günstige Wirkung der Pufferung auch bei der Vergärung der Brenztraubensäure unter ungewöhnlichen Bedingungen (vgl. S. 4, 5, 7, 9 usw.) in entsprechender Weise geltend macht, d. h. mit zellfreien Dauerpräparaten, mit dialysierten oder ausgegorenen Säften.

Weiter angestellt wurde eine Reihe von

Versuchen mit frischen Hefen und mit Hefesäften, die sich auf längere Zeit erstreckten

und in denen die während des Versuches entwickelte Kohlensäuremenge genau gemessen wurde.

Bis auf zwei Ansätze, bei denen die Ermittlung der entwickelten Kohlensäure durch Bestimmung des Gewichtsverlustes erfolgte, wurden diese Versuche in Eudiometern von 120 ccm Fassungsraum unter Quecksilberverschluß angestellt, und zwar im Brutschrank bei 28°. Bei jedem Ansatz wurde gleichzeitig und unter denselben Bedingungen eine Gärung von freier Brenztraubensäure, von gepufferter Brenztraubensäure und einer Kontrolle auf Selbstgärung der betr. Hefe angestellt; in einigen Fällen wurde in einem vierten Versuch die Selbstgärung bei Gegenwart sehr geringer Mengen von brenztraubensaurem Ka-

lium geprüft wegen des möglicherweise fördernden Einflusses[1]) von brenztraubensaurem Salz auf den Betrag der Selbstgärung. (S. hierzu S. 75 bis 93.)

Für jeden der Versuche wurden 3 bzw. 4 Eudiometer in der im folgenden beschriebenen Weise beschickt, mit Quecksilber vollgefüllt, alsdann umgekehrt in dieselbe, mit Quecksilber gefüllte Wanne getaucht und frei hängend an einem Stativ befestigt. In den angegebenen Zeitabständen wurde der obere Stand der wässerigen Flüssigkeit an den Röhren markiert und das dadurch angezeigte Volumen der Kohlensäure nach Beendigung des Versuches ausgemessen. Die Ansätze mit Hefesäften wurden in Azotometern angestellt, die eine unmittelbare Ablesung des wahren CO_2-Volumens gestatteten.

Die Ergebnisse der Versuche, die Herr Dr. Schwenck kontrolliert hat, sind tabellarisch wiedergegeben und zugleich durch Kurven veranschaulicht.

Versuch 1.

Beschickung:

A. 25 ccm Wasser,
5 „ 2 m-Brenztraubensäure,
3 g lebende Hefe K.

B. 20 ccm Wasser,
5 „ 2 m-Brenztraubensäure,
5 „ 2 m-K_2HPO_4,
3 g Hefe K.

C. 25 ccm Wasser,
5 „ 2 m-K_2HPO_4,
3 g Hefe K.

D. 30 ccm Wasser,
3 g Hefe K.

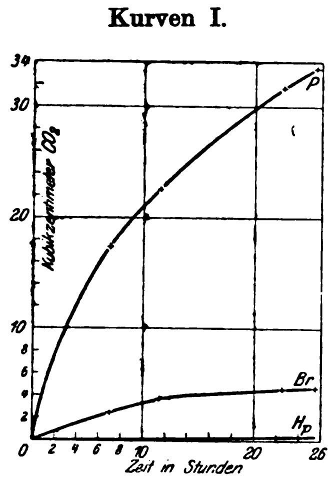
Gemessene Menge Kohlensäure in ccm. (Hierzu Kurven I.)

Zeit in Stunden	Versuch			
	A	B	C	D
7,0	2,5	17,4	0	0
11,5	3,8	22,6	Spur	Spur
22,5	4,6	31,6	Spur	Spur
25,5	4,6	33,6	0,25	0,2

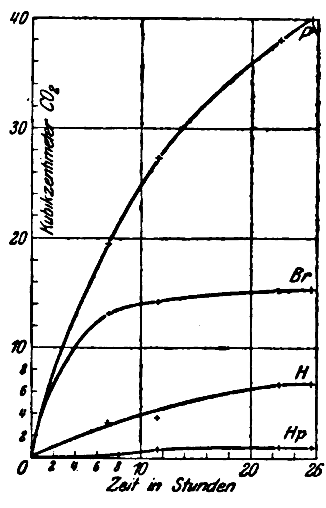
[1]) Dieser Einfluß erwies sich als gering (Versuch 5 u. 6) bei untergärigen Hefen, bei Oberhefen (Versuch 3 u. 4) war er nicht vorhanden; hier trat sogar eine Herabsetzung der Eigengärung zutage.


Kurven II.

Kurven I.



Unterhefe K.



Unterhefe MU.

Das Ergebnis dieses Versuches ist, daß in $25^1/_2$ Stunden aus der gepufferten Brenztraubensäure etwa das 7,25fache an Kohlensäure entwickelt worden war wie aus der freien Säure. Die Selbstgärung ist so gering, daß sie vernachlässigt werden kann[1]).

Versuch 2. (Hierzu Kurven II.)

Beschickung wie in Versuch 1, jedoch mit Hefe MU.

Gemessene Menge Kohlensäure in ccm.

Zeit in Stunden	Versuch			
	A	B	C	D
7,0	13,1	19,5	Spuren	3,1
11,5	14,2	27,3	0,8	3,7
22,5	15,3	38,0	1,0	6,7
25,5	15,3	40,0	1,0	6,7

[1]) In den Kurven bedeutet stets:

Br = Kurve des Gärverlaufes von freier Brenztraubensäure,
P = " des Gärverlaufes von gepufferter Brenztraubensäure,
H = " der Selbstgärung der verwendeten Hefeaufschwemmung,
H_p = " der Selbstgärung der mit dem Pufferungsmittel versetzten Hefeaufschwemmung,
H_k = " der Selbstgärung der mit Kaliumpyruvinat versetzten Hefeaufschwemmung.

Auch in diesem Versuch ist die aus der gepufferten Säure entwickelte Gasmenge ein Vielfaches der aus der freien Säure erhaltenen[1]).

Versuch 3. (Hierzu Kurven III.)

Beschickung:

A. 25 ccm Wasser,
5 „ 2 m-Brenztraubensäuse,
3 g Oberhefe XII.

B. 20 ccm Wasser,
5 „ 2 m-Brenztraubensäure,
5 „ 2 m-K_2HPO_4,
3 g Hefe XII.

C. 25 ccm Wasser,
5 „ 2 m-K_2HPO_4,
3 g Hefe XII.

D. 29,7 ccm Wasser,
0,3 „ m/10-Kaliumpyruvinat,
3 g Hefe XII.

Gemessene Menge Kohlensäure in ccm.

Zeit in Stunden	Versuch			
	A	B	C	D
5,5	17,3	5,7	1,6	0
9,5	18,3	13,0	6,9	0,3
21,5	19,3	28,0	11,8	3,7
26,5	20,3	31,0	13,5	4,7
32,0	20,3	35,3	15,3	5,7
45,5	20,3	49,1	17,8	11,0

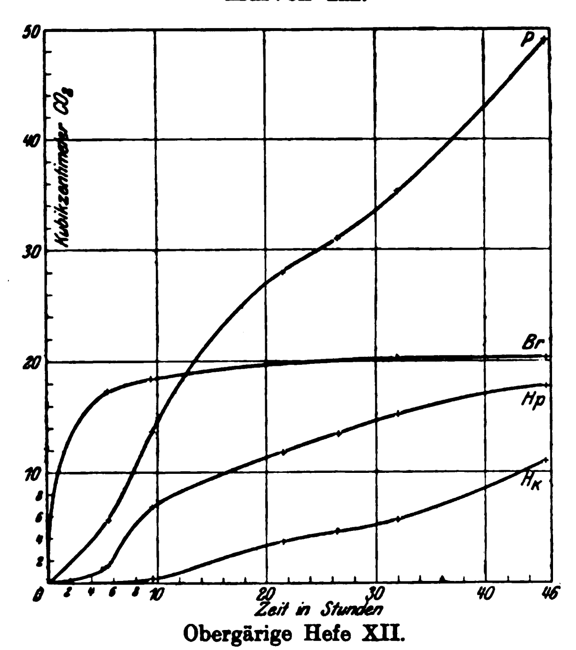
Versuch 4. (Hierzu Kurven IV.)

Beschickung wie in Versuch 3, nur Hefe der obergärigen Rasse OM.

[1]) Hervorgehoben sei bei diesem Versuch noch die Tatsache, daß die Selbstgärung der Hefe UM durch den Zusatz von Dikaliumphosphat deutlich herabgesetzt wird. Es bestätigt dies die von uns fast ausnahmslos gemachte Beobachtung (vgl. d. Zeitschr. **36**, 60 u. **51**, 133), daß ein Zusatz von Neutralsalz die Selbstgärung der Hefen herabdrückt. Es muß daher zweifelhaft bleiben, ob man berechtigt ist, von der bei einem Gärungsansatz erhaltenen Kohlensäuremenge den der Selbstgärung der Hefe für sich entsprechenden Betrag abzuziehen.



Kurven III.



Obergärige Hefe XII.

Gemessene Menge Kohlensäure in ccm.

Zeit in Stunden	Versuch			
	A	B	C	D
5,5	19,5	3,1	1,3	0,5
9,5	20,5	10,1	1,9	1,0
21,5	21,5	21,4	6,5	1,0
26,5	22,5	25,7	7,7	2,0
32,0	22,5	32,9	9,3	3,0
45,5	22,5	44,9	12,0	3,8

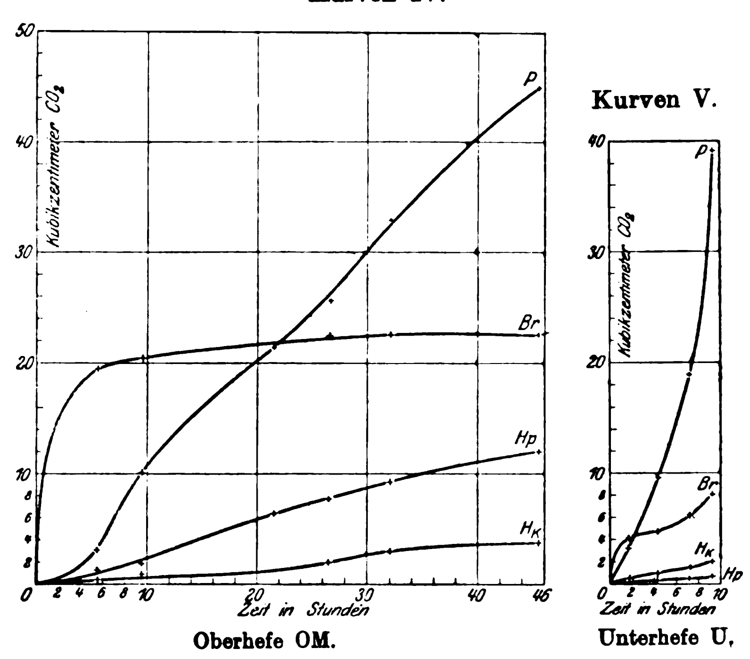
Versuch 5. (Hierzu Kurven V.)

Beschickung wie in den Versuchen 3 und 4, jedoch mit der Unterhefe U.

Gemessene Menge Kohlensäure in ccm.

Zeit in Stunden	Versuch			
	A	B	C	D
1,75	4,1	3,2	0,2	0,5
4,25	4,7	9,7	0,3	1,0
7,25	6,2	18,9	0,5	1,5
9,25	8,1	39,2	0,6	2,0





Oberhefe OM.

Unterhefe U.

Kurven VI.

Unterhefe K.

Versuch 6. (Hierzu Kurven VI.)

Beschickung wie in den Versuchen 3 bis 5, jedoch mit der Unterhefe K.

Gemessene Menge Kohlensäure in ccm.

Zeit in Stunden	Versuch			
	A	B	C	D
1,75	1,5	17,0	1,0	1,0
4,25	3,0	25,5	1,5	2,0
7,25	7,0	34,9	2,0	3,0
9,25	14,7	47,8	2,3	6,0

Die gleichen Ergebnisse hatte die Pufferung mit borsaurem Salz wie die folgenden Versuche 7 und 8 zeigen.

Versuch 7. (Hierzu Kurven VII.)

Beschickung:

A. 16,7 ccm Wasser,
3,3 „ 2 m-Brenztraubensäure,
2,0 g Hefe XII.

B. 13,4 ccm Wasser,
3,3 „ 2 m-Brenztraubensäure,
3,3 „ 2 m-NaH_2BO_3,
2,0 g Hefe XII.

C. 16,7 ccm Wasser,
3,3 „ m/2-$Na_2B_4O_7$ [1]),
2,0 g Hefe.

Gemessene Menge CO_2 in ccm.

Zeit in Stunden	Versuch		
	A	B	C
1	7,4	0,7	0,0
3	9,2	1,6	0,0
6,75	9,9	4,8	0,0
9	10,6	6,9	0,0
20,75	11,1	17,9	Spuren
30,75	11,6	19,9	„
46,75	—	24,6	„
68,75	12,2	30,6	„
116	13,7	39,9	0,2
164	14,2	40,3	0,2

Versuch 8. (Hierzu Kurven VIII.)

Beschickung wie in Versuch 7, jedoch mit Hefe MO.

Gemessene Menge Kohlensäure in ccm.

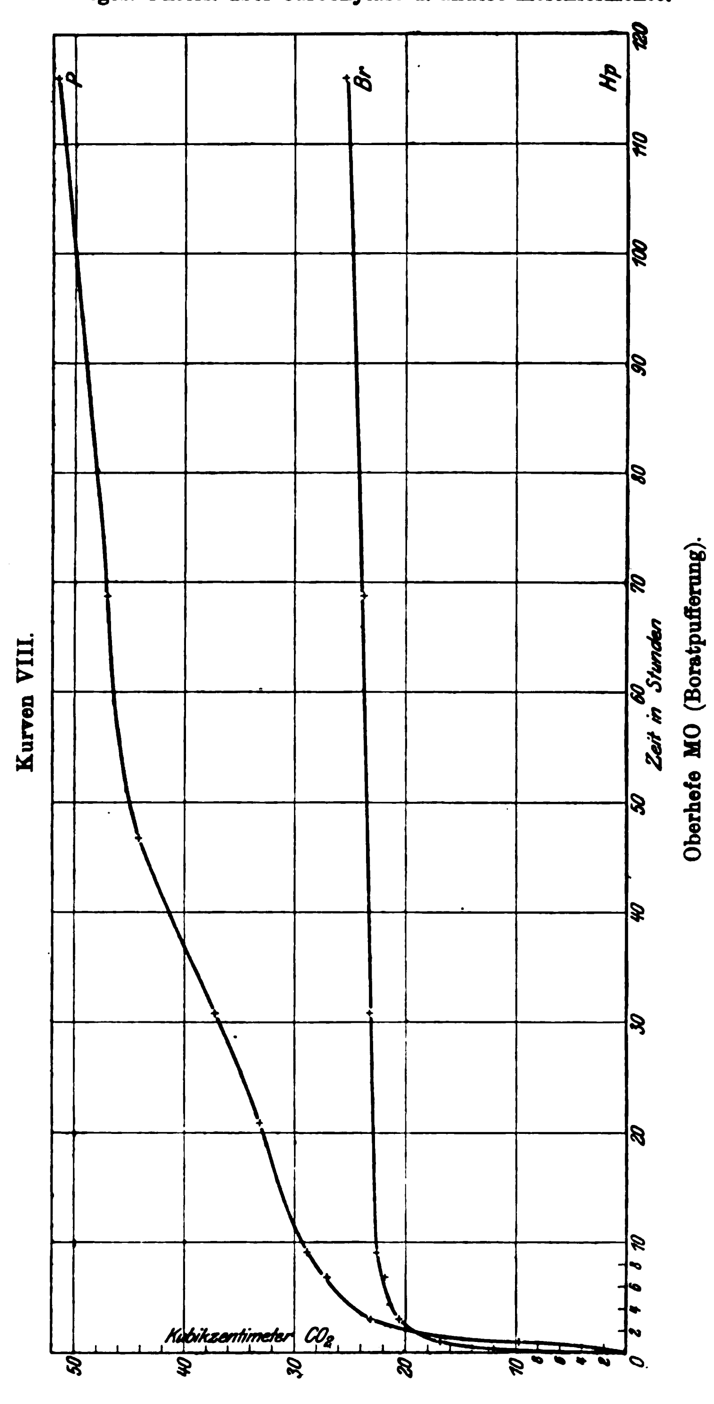
Zeit in Stunden	Versuch		
	A	B	C
1	16,9	9,8	0
3	20,6	23,1	0
6,75	21,8	27,1	0
9	22,5	28,9	0
20,75	—	33,1	0
30,75	23,2	37,2	0
46,75	—	44,1	0
68,75	23,9	47,0	0
116	25,4	51,5	0
164	26,4	53,9	0

[1]) Das entspricht gleichen Teilen 2 n-NaH_2BO_3 und 2 n-H_3BO_3.



Kurven VII.

Oberhefe XII (Boratpufferung).


Kurven VIII.
P
Br
Hp
Zeit in Stunden
0
2
4
6
8
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
Kubikzentimeter CO_2
Oberhefe MO (Boratpufferung).

Versuch 9. (Hierzu Kurven IX.)

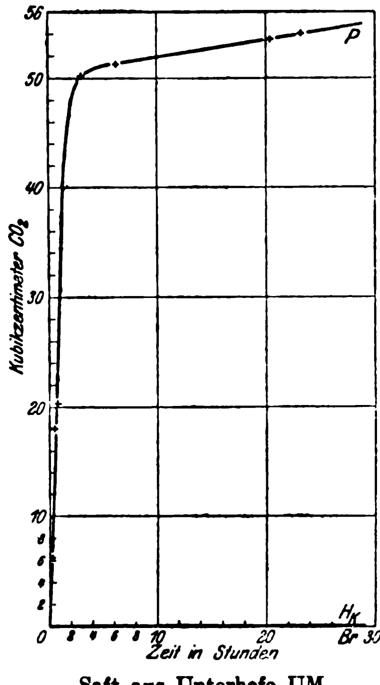
Beschickung:

A. 12 ccm Saft UM,
3,9 „ H_2O,
0,1 „ $^m/_{10}$-Kaliumpyruvinat,
1,0 „ Toluol.

B. 12 ccm Saft UM,
2 „ H_2O,
2 „ m-Brenztraubensäure,
1 „ Toluol.

C. 12 ccm Saft UM,
2 „ m-Brenztraubensäure,
2 „ m-K_2HPO_4,
1 „ Toluol.

Kurven IX.



Saft aus Unterhefe UM.

Gemessene Menge Kohlensäure in ccm.

Zeit in Stunden	Versuch A	Versuch B	Versuch C
0,25	0	0	6,2
0,5	0	0	18,0
0,75	0	0	20,2
3	0	0	50,2
6,25	0	0	51,2
20,25	0	0	53,5
23,25	0	0	54,3

Versuch 10. (Hierzu Kurven X.)

Beschickung wie Versuch 9, aber mit Saft K.

Gemessene Menge Kohlensäure in ccm.

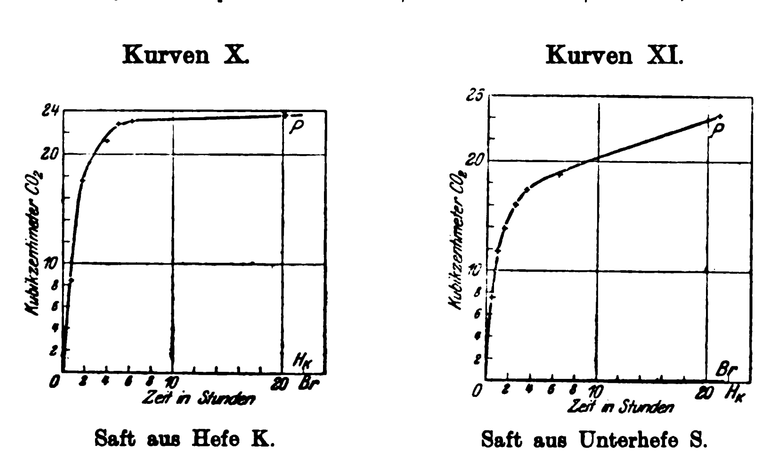
Zeit in Stunden	Versuch		
	A	B	C
0,75	0	0	8,4
1,75	0	0	17,6
4	0	0	21,2
5	0	0	22,8
6,25	0	0	23,0
20,25	0	0	23,6

Versuch 11. (Hierzu Kurven XI.)

Beschickung wie zuvor, jedoch mit Saft S.

Gemessene Menge Kohlensäure in ccm.

Zeit in Stunden	Versuch		
	A	B	C
0,5	0	0	7,6
1	0	0	11,8
1,5	0	0	13,8
2,5	0	0	16,0
3,5	0	0	17,4
6,5	0	0	18,8
21,0	0	0	24,2



Saft aus Hefe K.

Saft aus Unterhefe S.

Bemerkenswert ist, daß in diesen Säften die Gärung mit freier Brenztraubensäure gar nicht in Gang kam.

In den vorstehenden Versuchen wurde die Messung der entwickelten Kohlensäuremenge der Bestimmung entwichener CO_2 durch Gewichtsverlust von Gärkölbchen vorgezogen, weil bei dieser Anordnung die Ergebnisse genauer werden. Die Gründe dafür dürften zweifacher Art sein. Einmal macht sich der Wägefehler geltend, der infolge des Temperaturunterschieds im Brutschrank und auf der Wage auftritt. Eine Abkühlung der Gärkölbchen war untunlich, weil dadurch in den Gang der Versuche unübersehbare Unregelmäßigkeiten gebracht worden wären. Es besteht aber weiter die Möglichkeit, daß durch den Gärverschluß mit Schwefelsäure bei energischer Gärung Acetaldehyd entweicht, da diese flüchtige Substanz von Schwefelsäure nicht völlig zurückgehalten wird bez. damit reagiert. Im Eudiometer aber erhält man unbedingt die gesamten Reaktionsprodukte.

Unter ausdrücklichem Hinweis auf diese Ungenauigkeiten seien zwei Vorversuche mitgeteilt, bei denen der Verlauf der Gärung durch Wägung verfolgt worden war. Wenn auch nach unserer Meinung dieses Verfahren im vorliegenden Falle nicht einwandfrei ist, so sind immerhin die Ausschläge so stark, daß über ihre Bedeutung kein Zweifel obwalten kann. Auch hier trat die weit stärkere Vergärung der gepufferten Brenztraubensäure zutage.

Versuch 12.

300 ccm fassende Erlenmeyerkolben aus Jenaer Glas wurden in nachstehender Weise beschickt, mit einem Gärverschluß versehen und in den Brutschrank von 28° gebracht.

Beschickung:

A. 25 ccm Wasser,
5 „ 2 m-Brenztraubensäure,
3 g frische Hefe MU.

B. 20 ccm Wasser,
5 „ 2 m-Brenztraubensäure,
5 „ 2 m-K_2HPO_4,
3 g Hefe MU.

C. 20 ccm Wasser,
10 „ 2 m-KH_2PO_4,
3 g Hefe MU.

D. 29,7 ccm Wasser,
0,3 „ $^{m}/_{10}$-Kaliumpyruvinat,
3,0 g Hefe MU.

Gewichtsverlust der Gärkolben in mg.

Zeit in Stunden	Versuch			
	A	B	C	D
5,5	42	39	16	22
17,5	46	83	19	23
29,0	44	139	14	25
41,0	44	174	17	23
48,0	39	191	14	23

Versuch 13.

Beschickung: Wie in Versuch 12, jedoch mit frischer Unterhefe K.

Gewichtsverlust der Gärkolben in mg.

Zeit in Stunden	Versuch			
	A	B	C	D
5,5	24	24	17	8
17,5	23	34	20	12
29,0	20	69	20	6
41,0	20	104	10	12
48,0	16	123	4	14

III. Wirkung von Pufferungsgemischen bei Trockenhefen.

Auch die in den Trockenhefen vorhandene Carboxylase äußert ihre Wirksamkeit kräftiger gegen gepufferte Lösungen von Brenztraubensäure als gegen die freie Säure selbst. Die Trockenhefen schließen sich in ihrem Verhalten also völlig den frischen Hefen sowie den Macerationssäften an.

Die Versuche wurden in Azotometern angesetzt, in denen das wahre Volumen der entwickelten CO_2 direkt abgelesen werden konnte.

Versuch 1. (Hierzu Kurven XII.)

Temp. 28°.

Beschickung:

A. 29,9 ccm H_2O,
0,1 „ $^{m}/_{10}$-Kaliumpyruvinat,
1,0 g Trockenhefe UM,
2,0 ccm Toluol.
} (Kontrolle auf Selbstgärung)

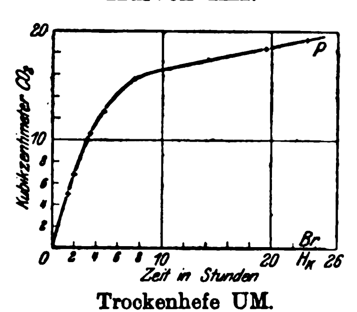
B. 25,0 ccm H_2O,
5,0 „ m-Benztraubensäure,
1,0 g Trockenhefe UM,
2,0 ccm Toluol.

C. 20,0 ccm H_2O,
5,0 „ m-Brenztraubensäure,
5,0 „ m-K_2HPO_4,
1,0 g Trockenhefe UM,
2,0 ccm Toluol.

Gemessene Menge Kohlensäure in ccm.

Zeit in Stunden	Versuch		
	A	B	C
1,5	0	0	5,0
2	0	0	6,8
3,5	0	Spur	10,6
4,75	0	„	12,6
7,5	0	„	15,6
19,5	0	„	18,3
23,25	0	„	19,7

Kurven XII.



Trockenhefe UM.

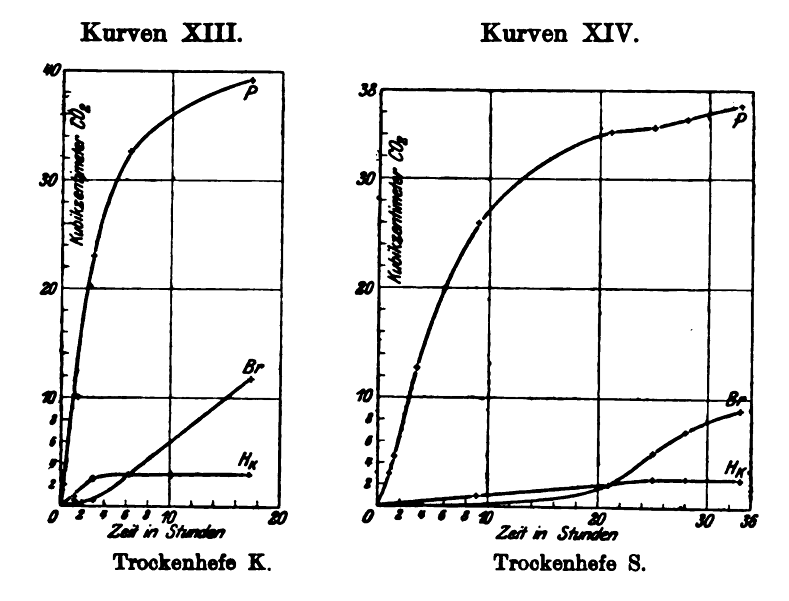
Versuch 2. (Hierzu Kurven XIII.)

Beschickung genau wie in Versuch 1, jedoch mit Trockenhefe K.

Gemessene Menge Kohlensäure in ccm.

Zeit in Stunden	Versuch		
	A	B	C
1,25	1,0	0,5	10,2
3	2,5	0,5	23,0
6,25	3,0	3,0	32,6
17.25	3,0	11,8	39,2

Kurven XIII. Kurven XIV.



Trockenhefe K. Trockenhefe S.

Versuch 3. (Hierzu Kurven XIV.)

Beschickung wie zuvor, jedoch mit Trockenhefe S.

Gemessene Menge CO_2 in ccm.

Zeit in Stunden	Versuch		
	A	B	C
1,0	0	0	3,0
1,5	0	0	4,6
3,5	Spur	0	12,8
9,0	1,1	Spur	26,0
21,0	2,0	2,0	34,2
25,0	2,5	5,1	34,6
28,0	2,5	7,1	35,4
33,0	2,5	9,0	36,6

Bei allen 3 Trockenhefen tritt die überlegene Gärfähigkeit der gepufferten Brenztraubensäure hervor; die Kurven sind ganz ähnlich und voneinander nur durch jene kleine Abweichungen unterschieden, die durch die bekannten Schwankungen im Verhalten der einzelnen Hefenrassen bedingt werden.

Somit kann man sämtlichen Versuchen — und ganz augenfällig dem Verlaufe der entsprechenden Kurven — mit Sicherheit entnehmen, daß die Menge der entwickelten Kohlensäure bei Anwendung von Moderatoren größer ist als bei der

freien Brenztraubensäure. Dabei tritt — im Falle der Vergärung mit frischen Hefen — die Erscheinung zutage, daß die freie Säure im Anfang des Versuches manchmal ausgiebiger gärt[1]), daß aber stets die gepufferte Säure bald einen Vorsprung gewinnt, den sie bis zum Schluß der Versuche beibehält.

Der Grund für die anfänglich geringere Kohlensäureentwicklung aus der gepufferten Lösung kann zum Teil auch mit den komplizierten Reaktionsverhältnissen in den Mischungen zusammenhängen.

Nimmt man der Einfachheit wegen an, daß die Hauptmenge von Brenztraubensäure und Dikaliumphosphat sich umsetzen zu Kaliumpyruvinat und Monokaliumphosphat, so entsteht bei der Gärung zunächst neben Acetaldehyd Kaliumbicarbonat. Dieses reagiert mit saurem Phosphat unter Bildung von Dikaliumphosphat und freier Kohlensäure. Da aber Dikaliumphosphat zum Teil dissoziiert in primäres Phosphat und Kaliumhydroxyd, so wird ein Teil der Kohlensäure gebunden. Diese Verhältnisse, die durch die Gegenwart der Hefe noch verwickelter werden, könnten dazu führen, daß sogar weniger Kohlensäure entbunden wird, als durch den Gärungsakt aus der Brenztraubensäure entsteht. Noch unübersichtlicher werden die Verhältnisse dadurch, daß auch eine merkliche Dissoziation[2]) des Kaliumbicarbonats bei der Versuchstemperatur eintritt und die Hefe selbst sauer reagiert und während des Gäraktes noch neue H-Ionen hervorbringt.

Alles in allem darf man schließen, daß aus einem solchen gepufferten System nicht alle entstandene Kohlensäure gasförmig zu entweichen braucht, so daß die Rate der Vergärung in dem gepufferten System größer sein kann, als die Kohlensäureentbindung anzeigt[3]).

---

[1]) Dieses Verhalten zeigt sich bei den Konzentrationsverhältnissen, wo die Brenztraubensäure z. B. in $^{m}/_{3}$-Lösung vorliegt. Bei höheren Konzentrationen kehrt sich das Verhältnis um, wie aus den voranstehenden abgekürzten Versuchen hervorgeht. So gor unter dort innegehaltenen Bedingungen eine $^{2}/_{3}$-molekulare freie Brenztraubensäure überhaupt nicht oder kaum mehr, während sie in gepuffertem Zustande kräftig zerlegt wurde.

[2]) Siehe Gmelin-Kraut, Handbuch II. 1. S. 162—163, 1906.

[3]) In der Tat kann man durch nachträglichen Zusatz von Säure zum Gärgut öfter noch Kohlensäure freimachen.

Wenn nun bei der Vergärung von freier Brenztraubensäure, wo eine solche Zurückhaltung der Kohlensäure fortfällt, weniger Kohlensäure entwickelt wird, so muß der Grund dafür in irgendeiner Störung des Fermentvorganges durch die starke Säure gelegen sein; daraut hin weisen die Versuche mit den empfindlicheren Hefensäften (S. 31 bis 33 und S. 42 bis 43). Tatsächlich ließ sich eine solche Beeinträchtigung der Carboxylase durch freie Brenztraubensäure in besonderen Versuchen sehr einfach nachweisen (s. S. 70 bis 75).

2. Einfluß von Alkalien und Säuren.

Gleich der freien und gepufferten Brenztraubensäure werden nach unseren früheren Erfahrungen auch die Alkalisalze der Brenztraubensäure und anderer Ketosäuren vergoren. Bei dieser Vergärung entsteht bemerkenswerterweise kohlensaures bzw. doppeltkohlensaures Alkali, das demnach für die Carboxylase kein sehr erhebliches Gift darstellt. Dieser Umstand war uns Veranlassung, die Einwirkung zugesetzter Lauge auf die Carboxylase zu studieren. Wir hofften zugleich, auf Grund dieser relativen Resistenz der Carboxylase eine neue Abtrennung dieses Fermentes vom Zymasekomplex zu erreichen, ähnlich wie dieses mit anderen Zusätzen [1]) möglich gewesen ist. Diese Erwartung hat sich jedoch nicht erfüllt; denn wenn man die zugesetzte Lauge durch die äquivalente Menge Säure [2]) neutralisiert, so erwies sich, je nach Stärke der Lauge und Einwirkungsdauer, entweder jede Fermentwirkung als vernichtet, oder es waren Carboxylase und Zymase beide erhalten.

A. 100 ccm Macerationssaft aus Hefe U wurden mit 50 ccm 2 n-KOH vermischt, 5 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen und dann mit 50 ccm 2 n-HCl neutralisiert. Verfährt man bei dem Zusatz der Reagenzien mit einiger Vorsicht, so erfolgt nur Trübung, aber keine Fällung. Weder mit Rohr-

[1]) C. Neuberg und N. Iwanoff, diese Zeitschr. 67, 1, 1914.

[2]) In umgekehrter Reihenfolge dürfen die Reagenzien nicht angewendet werden, da Säure die Macerationssäfte vollkommen zum Gerinnen bringt. Die spätere Zugabe von Lauge bewirkt zwar teilweise Verflüssigung, doch bleibt ein beträchtliches Eiweißcoagulum ungelöst. Das Filtrat von diesem wirkt noch auf Glukose und gepufferte Brenztraubensäure.

oder Traubenzucker noch mit gepufferter Brenztraubensäure trat eine Gärung ein.

B. 100 ccm Hefesaft aus Hefe U wurden mit 50 ccm $^1/_{10}$ n-KOH versetzt und sofort mit 50 ccm $^1/_{10}$ n-HCl neutralisiert. Die Gärkraft war jetzt nicht wesentlich geschädigt.

C. 100 ccm Hefesaft aus Hefe U wurden mit 50 ccm $^1/_{10}$ n-KOH 5 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen und dann mit 50 ccm $^1/_{10}$ n-HCl neutralisiert. Die Gärkraft wird nicht merklich herabgesetzt.

D und E. 100 ccm Saft aus Trockenhefe S wurden mit 50 ccm $^1/_{10}$ n-KOH 15 bzw. 30 Minuten lang bei 37° stehen gelassen und dann mit 50 ccm $^1/_{10}$ n-HCl neutralisiert. Die Gärkraft war im Vergleich zum nichtvorbehandelten Saft nicht erheblich vermindert.

F. 100 ccm Saft aus Trockenhefe S wurden mit 50 ccm $^1/_2$ n-NaOH 15 Minuten bei 37° digeriert und dann mit 50 ccm $^1/_2$ n-HCl neutralisiert. Alsdann wurden die Gärproben in der Weise angesetzt, daß je 10 ccm vorbehandelter Saft mit 10 ccm Substratlösung gemischt wurden. Letztere war 9%ige Glucoselösung bzw. nach Pufferung[1]) molekulare Brenztraubensäure. Als Kontrolle diente entsprechend verdünnter nativer Saft, der mit der gleichen Menge derselben Glucose bzw. Brenztraubensäurelösung versetzt war. Die Mischungen wurden in Gärröhrchen von 11 ccm Kapazität gefüllt.

Zeit in Stunden	Entwickelte ccm CO_2 aus vorbehandeltem Saft mit		Entwickelte ccm CO_2 aus nichtvorbehandeltem Saft mit	
	Glucose	gepufferter Brenztraubensäure	Glucose	gepufferter Brenztraubensäure
0,5	0	1,5	0,1	5
1,0	0	3,5	0,2	10
2,0	0	11,0	0,5	11
19,0	11	—	11,0	—

G. Eben solcher Ansatz mit dem gleichen Saft, aber nach Vorbehandlung desselben mit $^1/_5$ n-Lösungen.

1) Gleiche Teile 2 m-K_2HPO_4 und 2 m-$CH_3.CO.COOH$.

Zeit in Stunden	Entwickelte ccm CO_2 aus vorbehandeltem Saft mit Glucose	Entwickelte ccm CO_2 aus vorbehandeltem Saft mit gepufferter Brenztraubensäure	Entwickelte ccm CO_2 aus nichtvorbehandeltem Saft mit Glucose	Entwickelte ccm CO_2 aus nichtvorbehandeltem Saft mit gepufferter Brenztraubensäure
0,5	0	3	0,0	9
1,5	0	11	0,5	11
19,0	11	—	11,0	—

H. 100 ccm Saft aus Hefe U wurden mit 100 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH 120 Minuten bei 37° stehen gelassen, dann mit 100 ccm $^1/_{10}$ n-HCl neutralisiert. Ansatz wie oben mit Glucose und gepufferter Brenztraubensäurelösung.

Zeit in Stunden	Entwickelte ccm CO_2 aus vorbehandeltem Saft mit Glucose	Entwickelte ccm CO_2 aus vorbehandeltem Saft mit gepufferter Brenztraubensäure	Entwickelte ccm CO_2 aus nichtvorbehandeltem Saft mit Glucose	Entwickelte ccm CO_2 aus nichtvorbehandeltem Saft mit gepufferter Brenztraubensäure
1	0,0	6	1	9
5	0,5	11	6	11

(Versuch abgebrochen.)

J. 50 ccm Saft U wurden mit 20 ccm H_2O verdünnt und mit 8 ccm n-HCl tropfenweise versetzt. Dann wurden 4 ccm 2 n-KOH hinzugesetzt. Nach kräftigem Umschütteln wurde von dem dicken Koagulum abfiltriert, das bei dem hier gewählten umgekehrten Zusatz der Reagenzien auftritt.

Das klare Filtrat rief noch Gärung hervor:

15 ccm Filtrat + 2 ccm 2 m-Brenztr. + 2 ccm K_2HPO_4 lieferten nach 3 Stdn.: 11 ccm CO_2;

15 „ „ + 4 „ 9 %ige Glucoselösung ergaben nach 15 Stdn.: 11 ccm CO_2.

Als ein weiteres Ergebnis dieser Versuche ist hervorzuheben, daß Macerationssäfte eine viertelstündige Digestion mit der Hälfte ihres Volumens an $^1/_2$ n-KOH bei 37° vertragen, ohne daß die in ihnen enthaltene Carboxylase und Zymase zerstört werden. Neutralisiert man alsdann mit $^1/_2$ n-HCl, so erweisen sich beide Fermente als verhältnismäßig wenig abgeschwächt. Die Vorbehandlung mit $^1/_{10}$ n-KOH kann sogar auf 2 Stunden bei 37° ausgedehnt werden.

Nach diesen Versuchen erscheint die Zymase viel beständiger als man gewöhnlich angenommen hat.

3. Einfluß von organischen Körpern.

Die große Unabhängigkeit der Carboxylase von Zusätzen organischer Natur geht schon aus den Untersuchungen von Neuberg und Iwanoff (l. c.) über diesen Gegenstand hervor. Bemerkenswert ist, daß die Carboxylase auch in alkoholischer Lösung wirkt, daß sie Methylalkohol und die Alkohole des Fuselöls in hoher Konzentration verträgt und selbst bei Gegenwart von Aceton und Pyridin tätig ist.

Die neuen Erfahrungen über die Einwirkung von Zusätzen auf die Carboxylase ergeben sich aus der folgenden Übersicht:

I. Zusatz von Äthylalkohol.

Wirkung der Carboxylase in alkoholischen Lösungen.

a) Frische Hefen.

1. Gehalt von 10 % Alkohol.

Temp. 37°.

Zur Verwendung kam eine Lösung, die durch Auffüllung von 0,88 g Brenztraubensäure und 10 ccm absol. Äthylalkohol mit Wasser zu 100 ccm erhalten war.

α) 16 ccm der 10 %igen Alkohollösung
1,6 g Hefe OM.

Entw. ccm CO_2 nach	30′	2^h	$13{,}5^h$
	0,2	5	9

β) 16 ccm der 10 %igen Alkohollösung
1,6 g Hefe XII.

Entw. ccm CO_2 nach	30′	2^h	$13{,}5^h$
	0,3	6	9,5

γ) 16 ccm der 10 %igen Alkohollösung
1,6 g Hefe UM.

Entw. ccm CO_2 nach	30′	2^h	$13{,}5^h$
	3	5	6,5

δ) 16 ccm der 10 %igen Alkohollösung
1,6 g Hefe K.

Entw. ccm CO_2 nach	30′	2h	13,5h
	2	3	3

2. Gehalt von 20 % Alkohol.

Temp. 28°.

Benutzt wurde eine Lösung von 0,88 g Brenztraubensäure bzw. 0,9 g Rohrzucker in 20 %igem Alkohol.

α) 16 ccm der 20 %igen Alkohollösung von Brenztraubensäure
1,6 g Hefe OM.

Entw. ccm CO_2 nach	5h	12h	24h
	1,5	1,5	2,5

β) 16 ccm der 20 %igen Alkohollösung von Rohrzucker
1,6 g Hefe OM.

Entw. ccm CO_2 nach	5h	12h	24h
	0,75	3	3

γ) 16 ccm der 20 %igen Alkohollösung von Brenztraubensäure
1,6 g Hefe XII.

Entw. ccm CO_2 nach	5h	12h	24h
	3	3,5	3,5

δ) 16 ccm der 20 %igen Alkohollösung von Rohrzucker.
1,6 g Hefe XII.

Entw. ccm CO_2 nach	5h	12h	24h
	1,5	6,5	6,5

ε) 16 ccm der 20 %igen Alkohollösung von Brenztraubensäure
1,6 g Hefe UM.

Entw. ccm CO_2 nach	5h	12h	24h
	0	0	1

ζ) 16 ccm der 20 % igen Alkohollösung von Rohrzucker
1,6 g Hefe UM.

Entw. ccm CO_2 nach	5^h	12^h	24^h
	5	5,5	5,5

η) 16 ccm der 20 % igen Alkohollösung von Brenztraubensäure
1,6 g Hefe K.

Entw. ccm CO_2 nach	5^h	12^h	24^h
	0	0,5	2

ϑ) 16 ccm der 20 % igen Alkohollösung von Rohrzucker
1,6 g Hefe K.

Entw. ccm CO_2 nach	5^h	12^h	24^h
	1	1	2

Bei einem Gehalt der Lösung von 30 und 50 % Alkohol äußerten frische Ober- und Unterhefen keine Carboxylasewirkung mehr.

b) Macerationssäfte.

Der hohe Alkoholgehalt schafft infolge osmotischer Veränderungen offenbar Verhältnisse, die die Wirksamkeit der Carboxylase erschweren. Diese Bedingungen fallen bei Verwendung von Macerationssäften fort, und so kommt es, daß hier die **Carboxylase noch bei einem Gehalt von 20 und 30 % Alkohol tätig ist.**

Gehalt von 20 % Alkohol.
Temp. 28°.

α) 14 ccm Saft aus Hefe UM
1 " 2 m-K_2HPO_4
1 " 2 m-Brenztraubensäure
4 " absoluten Alkohol.

Nach 1^h: 6 ccm CO_2; nach $2{,}5^h$: 11 ccm CO_2.

Gehalt von 30 % Alkohol.
Temp. 28°.

β) 10,6 ccm Saft aus Hefe K
1,0 " 2 m-K_2HPO_4
1,0 " 2 m-Brenztraubensäure
5,4 " absoluten Alkohol.

Nach 1^h: 11 ccm CO_2.

Bei den Versuchen mit Saft muß der Zusatz des Alkohols tropfenweise und unter Umschütteln geschehen. Es darf keine Zusammenklumpung, sondern nur eine Ausflockung in kleinen Partikelchen erfolgen.

Infolge des Fortfalls osmotischer Störungen wurden zu den folgenden Versuchen nur Macerationssäfte verwendet.

II. Zusatz von Methylalkohol.

Temp. 28°.

12 ccm Saft U
2 „ 2 m-K_2HPO_4
2 „ 2 m-Brenztraubensäure
1,8 „ abs. Methylalkohol.

Das Gemisch blieb fast klar und entwickelte in 1 St.: 11 ccm CO_2.

III. Zusatz von n-Propylalkohol.

Temp. 28°.

12 ccm Saft U
2 „ 2 m-K_2HPO_4
2 „ 2 m-Brenztraubensäure
1,8 „ normal Propylalkohol.

Es trat mäßige Koagulation ein; das gefällte Eiweiß klebte am Ende des Versuchs an den Wandungen:

Nach 2 St.: 9 ccm CO_2, nach 3 St.: 11 ccm CO_2.

IV. Zusatz von Isopropylalkohol.

Temp. 28°.

12 ccm Saft U
2 „ 2 m-K_2HPO_4
2 „ 2 m-Brenztraubensäure
1,8 „ Isopropylalkohol.

Starke Fällung; nach 2 St.: 5 ccm CO_2, doch war das restierende Koagulum noch von zahlreichen Blasen durchsetzt.

V. Zusatz von Amylalkohol.

Temp. 28°.

12 ccm Saft U
2 „ 2 m-K_2HPO_4
2 „ 2 m-Brenztraubensäure
1,8 „ käufl. „Amylalkohol“.

Nach 4 St.: 5 ccm CO_2 und ein hartes undurchdringliches Koagulum.

VI. Zusatz von Ätylenglykol.

Temp. 28°.

12 ccm Saft S
2 „ 2 m-K_2HPO_4
2 „ 2 m-Brenztraubensäure
1,8 „ Äthylenglykol.

Die Mischung blieb völlig klar; sie entwickelte in 30 Min.: 8 ccm CO_2 und in 60 Min.: 11 ccm CO_2.

VII. Zusatz von Glycerin.[1]

Temp. 28°.

α) 12 ccm Saft S
2 „ 2 m-K_2HPO_4
2 „ 2 m-Brenztraubensäure
1,8 „ Glycerin (D = 1,26).

Aus der völlig klaren Mischung entwickelten sich in 30 Min.: 7,5 ccm CO_2, in 60 Min.: 11 ccm CO_2.

Temp. 28°.

β) 8 ccm Saft S
2 „ 2 m-K_2HPO_4
2 „ 2 m-Brenztraubensäure
8 „ Glycerin (D = 1,26).

Diese 40% Glycerin enthaltende Flüssigkeit blieb klar und lieferte in 1 St.: 11 ccm CO_2.

VIII. Zusatz von Acetaldehyd.

Temp. 28°.

α) 12 ccm Saft U
2 „ 2 m-K_2HPO_4
2 „ 2 m-Brenztraubensäure
1,8 „ wasserfreier Acetaldehyd.

Die Lösung bleibt klar, färbt sich später braun.
Nach 1 St.: 11 ccm CO_2.

---

[1]) Vgl. C. Neuberg u. J. Kerb, diese Zeitschr. **53**, 407, 1913.

Temp. 17 bis 18°.

β) 12 ccm Saft S
2 „ 2 m-K_2HPO_4
2 „ 2 m-Brenztraubensäure
1,8 „ wasserfreier Acetaldehyd.

Nach 1 St.: 5, nach 2 St.: 11 ccm CO_2 (starke Braunfärbung).

IX. Zusatz von Acetaldehyd-Ammoniak.

Temp. 28°.

14 ccm Saft U
2 „ 2 m-K_2HPO_4
2 „ 2 m-Brenztraubensäure
0,25 g festes Aldehyd-Ammoniak.

Nach 15 Min.: 5,5 ccm CO_2, nach 30 Min.: 7 ccm. Dann erfolgt völlige Gelatinierung unter Bräunung.

X. Zusatz von Propylaldehyd.

Temp. 28°.

12 ccm Saft U
2 „ 2 m-K_2HPO_4
2 „ 2 m-Brenztraubensäure
1,8 „ Propionaldehyd.

Nach 1 St.: 5 ccm CO_2, nach 2 St.: 9,5 ccm CO_2; das Gemisch ist deutlich getrübt.

XI. Zusatz von Aceton.

Temp. 28°.

12 ccm Saft U
2 „ 2 m-K_2HPO_4
2 „ 2 m-Brenztraubensäure
1,8 „ reines Aceton.

Es tritt mäßige Trübung auf; nach 1 St.: 6 ccm CO_2, nach 2 St.: 11 ccm CO_2.

XII. Zusatz von Pyridin.

Temp. 28°.

12 ccm Saft U
2 „ 2 m-K_2HPO_4
2 „ 2 m-Brenztraubensäure
0,5 „ reines, über BaO dest. Pyridin.

Das Gemisch trübt sich diffus.

Nach 30 Min.: 6 ccm CO_2, nach 45 Min.: 11 ccm CO_2.

Der Versuch wurde mit Saft K wiederholt und gab das gleiche Ergebnis.

Beide Ansätze reagierten nach dem Stehen über Nacht (18 St.) noch alkalisch. Erhöht man die Menge des Pyridins in denselben auf 1 ccm, so erfolgt Gelatinierung und gänzliche Unterdrückung der Gärung.

Da die Resistenz der Carboxylase gegen Pyridin recht auffallend ist, so haben wir als Kontrolle folgenden Versuch angestellt:

12 ccm	H_2O
2 „	2 m-K_2HPO_4
2 „	2 m-Brenztraubensäure
0,5 „	Pyridin.

Auch nach 48 St. war keine Spur CO_2 entwickelt; eine Zerlegung der Brenztraubensäure unter dem Einfluß des Pyridins, an die man hätte denken können, findet also nicht statt.

Aus den mitgeteilten Versuchen ergibt sich eine beachtenswerte Unempfindlichkeit der Carboxylase gegen allerlei Zusätze und namentlich gegen Substanzen, mit denen sie unter natürlichen Verhältnissen in Berührung kommen kann, wie gegen ein- und mehrwertige Alkohole sowie Aldehyde.

E. Vergleich der Vergärung höherer Ketosäuren in freier und gepufferter Form.

Ganz unzweifelhaft und unverkennbar ist der Einfluß einer geeigneten Pufferung auf den Verlauf und den Umfang der Brenztraubensäuregärung. Nicht so eindeutig ist die Wirkung der Moderatorensysteme auf die Vergärung der höheren Ketosäuren. Wir haben schon früher, gelegentlich der Untersuchung der einzelnen Homologen der Brenztraubensäure, erwähnt, daß diese Ketosäuren sowohl in freiem als in gepuffertem Zustande vergoren werden. Der Reaktionsverlauf ist bei den Homologen der Brenztraubensäure zwar grundsätzlich der gleiche wie bei dem Anfangsgliede der Ketosäurenreihe. Allein die sekundären Umwandlungen des zunächst gebildeten Aldehyds treten bei den höheren Gliedern quantitativ mehr in den Vordergrund. So entsteht bei der Vergärung der α-Ketobuttersäure neben dem Propionaldehyd viel normaler Propyl-

alkohol[1]). Bei der Vergärung der Methyl-äthyl-brenztraubensäure tritt neben Valeraldehyd und Valeriansäure eine beträchtliche Menge Amylalkohol auf[2]). Diese Erscheinungen hängen offenbar mit der von uns eingehend studierten phytochemischen Reduktion der Aldehyde[3]) zusammen, die sich bei den hier in Betracht kommenden Aldehyden mit besonderer Leichtigkeit vollzieht. Man wird vielleicht nicht fehlgehen, wenn man in der Umwandelung des primär entstehenden Gärungsproduktes ein wichtiges Moment für das Fortschreiten der Carboxylasegärung der höheren Ketosäuren erblickt. Mit Störungen in diesen Korrelationen mag es nun zusammenhängen, daß die höheren Ketosäuren sich auch insofern etwas anders verhalten, als bei ihnen die Anwendung von Moderatoren der Schnelligkeit und dem Umfange der Vergärung nicht förderlich ist. Daneben spielt natürlich auch eine Kohlensäurebindung durch das Kation der Moderatoren mit.

Über den Ausfall der Versuche selbst, die sowohl mit frischen Hefen als mit Macerationssäften bei verschiedenen Temperaturen ausgeführt worden sind, orientieren nachfolgende Tabellen:

1. Vergärung durch frische Hefen.

Temp. 28°.

α) 12 ccm H_2O
4 „ $m/_2$-Oxalessigsäure (Oxymaleinsäure)
1,6 g Hefe OM.

Entw. ccm CO_2 nach	30′	1h	2h
	1,5	3	10

β) 10 ccm H_2O
2 „ 2 m-K_2HPO_4
4 „ $m/_2$-Oxalessigsäure
1,6 g Hefe OM.

Entw. ccm CO_2 nach	30′	1h	2h
	0,5	2	4

---

[1]) C. Neuberg u. Joh. Kerb, diese Zeitschr. 61, 184, 1914.
[2]) C. Neuberg u. W. H. Peterson, diese Zeitschr. 67, 32, 1914.
[3]) C. Neuberg u. E. Welde, F. F. Nord, Steenbock u. a. diese Zeitschr. 1913—1914.

γ) 14 ccm H_2O
2 „ m-Ketobuttersäure
1,6 g Hefe OM.

Entw. ccm CO_2 nach	30′	1h	2h
	0,5	2	4

δ) 13 ccm H_2O
1 „ 2 m-K_2HPO_4
2 „ m-Ketobuttersäure.
1,6 g Hefe OM.

Entw. ccm CO_2 nach	30′	1h	2h
	0,5	1	2,5

2. Vergärung durch Macerationssäfte.

Zimmertemp. 14°.

α) 10 ccm Saft K
2 „ H_2O
4 „ m/2-Oxalessigsäure.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′	2h	15h
	1	2	3	4	11	—

β) 10 ccm Saft K
2 „ 2 m-K_2HPO_4
4 „ m/2-Oxalessigsäure.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′	2h	15h
	1	2,5	3,5	4	7	11

Temp. 28°.

γ) 10 ccm Saft UM
4 „ H_2O
2 „ m-α-Ketobuttersäure.

Entw. ccm CO_2 nach .	15′	30′	45′	60′	2h	15h	24h
	0,5	1	2	4	11	—	—

δ) 10 ccm Saft UM
3 „ H_2O
1 „ 2 m-K_2HPO_4
2 „ m-α-Ketobuttersäure.

Entw. ccm CO_2 nach .	15′	30′	45′	60′	2h	15h	24h
	0,1	0,5	0,6	0,7	2	4	5

ε) 10 ccm Saft K
2 „ H_2O
4 „ $^m/_2$-α-Ketocapronsäure.

Entw. ccm CO_2 nach .	15′	30′	45′	60′	2^h	15^h	24^h
	1	2	3,5	5	5,5	7	8

ζ) 10 ccm Saft K
1 „ H_2O
1 „ K_2HAsO_3
4 „ $^m/_2$-α-Ketocapronsäure.

Entw. ccm CO_2 nach .	15′	30′	45′	60′	2^h	15^h	24^h
	0	0	0	0	0,5	1,5	2,5

Hinzugefügt sei, daß nach neuen Erfahrungen auch die α-Ketoglutarsäure sich den vorerwähnten Substanzen anschließt.

F. Gegenwart von Carboxylase in plasmolysierten Hefen.

Unter dem Einflusse von Neutralsalzen und osmotisch wirksamen organischen Substanzen findet bekanntlich eine Verflüssigung der Hefezellen statt. Die resultierende Masse enthält Zymase. Da nun stets wirksame Carboxylase im Gefolge gärtüchtiger Zymase gefunden worden ist, war zu erwarten, daß nach erfolgter Plasmolyse in den verflüssigten Hefemassen Carboxylase nachweisbar sei. Das ist in der Tat der Fall und zwar bei Ober- und Unterhefen, die durch Kochsalz, Glycerin oder Rohrzucker zur Plasmolyse gebracht waren.

Die Plasmolyse wurde dadurch herbeigeführt, daß je 100 g Hefe OM und UM mit 10 g Glycerin, 10 g NaCl oder 20 g Rohrzucker in festem Zustande in einem Porzellanmörser verrieben wurden. In kurzer Zeit erfolgt dabei Verflüssigung.

Durch Zugabe von je 1,5 ccm Plasmolysensaft zu dem Gemisch von 8,5 ccm 2 m-Brenztraubensäure und 8,5 ccm 2 m-K_2HPO_4 wurde stets kräftige Carboxylasewirkung ausgelöst, die durch die Kohlensäureentwicklung und die Aldehydbildung erkannt wurde.

Für die mit Glycerin und NaCl erzeugten Plasmolysesäfte ließ sich eine angenähert gleich starke Zymasewirkung auf 9 %ige Glucose wie Carboxylasewirkung auf gepufferte m-Brenztraubensäure nachweisen.

G. Beziehungen der Carboxylase und ihrer Substrate zu anderen Hefenfermenten.

1. Unabhängigkeit der Carboxylase und Invertase voneinander.

In Anlehnung an die natürlichen Verhältnisse und auch aus Gründen der Bequemlichkeit dient zum Studium der Gärungserscheinungen vielfach der Rohrzucker. Er ist bekanntlich nicht unmittelbar dem Angriffe der Zymase zugänglich, sondern muß zuvor durch ein besonderes Ferment, die Invertase, gespalten — invertiert — werden. Bei Verwendung der üblichen ober- und untergärigen Hefen findet sich die Invertase stets neben den eigentlichen Gärungsfermenten. Es scheint jedoch wichtig, einmal prinzipiell festzustellen, ob der Vorgang der Rohrzuckerinvertierung durch eine gleichzeitig verlaufende Brenztraubensäure-Vergärung gehindert würde. Selbstverständlich konnte zu diesbezüglichen Versuchen nicht die an sich invertierende Brenztraubensäure benutzt werden, sondern nur ein neutrales Salz derselben. Zur Anwendung kamen Kalium- und Calciumpyruvinat. Es zeigte sich, daß die Spaltung derselben durch die Carboxylase die Rohrzuckerinversion keineswegs hindert, sondern eher steigert. Nimmt man die Versuche mit frischen Hefen in Gegenwart von Antisepticis vor, welche die Zymasewirkung aufheben, die Carboxylasetätigkeit aber nicht unterbinden, so häuft sich der Invertzucker an — kenntlich am Drehungsabfall und dem Auftreten eines äußerst starken Reduktionsvermögens. Bei Anstellung der Versuche mit Saft wird natürlich der Invertzucker nicht gespeichert, sondern vergoren. Aus der erheblichen Abnahme der Drehung ergibt sich seine Umsetzung. Dieses Verhalten ist um so bemerkenswerter, als bei der Vergärung der Pyruvinate die Hydroxylionenkonzentration zunimmt.

Um einen Einfluß von Carboxylase auf die Zymase zu erkennen, wurden Versuche über die enzymatische Rohrzuckerinversion vergleichsweise in rein wässeriger Lösung und in Anwesenheit von Pyruvinaten vorgenommen.

I. Wirkung von Invertase — Carboxylase in frischen Hefen.

a) 48stündige Digestion bei Zimmertemperatur (15 bis 19°).

α) 100 ccm 10 %ige Rohrzuckerlösung
100 „ H_2O

10 g Hefe OM
20 ccm Chloroform.

15 ccm der gut durchgeschüttelten Suspension wurden mit 1,5 ccm colloidalem Ferrihydroxyd geklärt und filtriert[1]).

Drehung im 2 dcm-Rohr entsprechend — 1,70 °/₀ Glucose.

β) 100 ccm 10 °/₀ige Rohrzuckerlösung
100 „ 1 °/₀ige Kaliumpyruvinatlösung
10 g Hefe OM
20 ccm Chloroform.

Drehung im 2 dcm-Rohr entsprechend — 2,05 °/₀ Glucose.

γ) 100 ccm 10 °/₀ige Rohrzuckerlösung
100 „ H_2O
10 g Hefe XII
20 ccm Chloroform.

Drehung im 2 dcm-Rohr entsprechend — 1,45 °/₀ Glucose.

δ) 100 ccm 10 °/₀ige Rohrzuckerlösung
100 „ 1 °/₀ige Kaliumpyruvinatlösung
10 g Hefe XII
20 ccm Chloroform.

Drehung im 2 dcm-Rohr entsprechend — 1,45 °/₀ Glucose.

ε) 100 ccm 10 °/₀ige Rohrzuckerlösung
100 „ H_2O
10 g Hefe K
20 ccm Chloroform.

Drehung im 2 dcm-Rohr entsprechend — 1,80 °/₀ Glucose.

ζ) 100 ccm 10 °/₀ige Rohrzuckerlösung
100 „ frisch bereitete 1 °/₀ige Calcium-pyruvinatlösung
10 g Hefe K
20 ccm Chloroform.

Drehung im 2 dcm-Rohr entsprechend — 2,00 °/₀ Glucose.

η) 100 ccm 10 °/₀ige Rohrzuckerlösung
100 „ H_2O
10 g Hefe UM
20 ccm Chloroform.

Drehung im 2 dcm-Rohr entsprechend — 1,75 °/₀ Glucose.

[1]) Dieselbe Behandlung erfolgte in allen entsprechenden Versuchen S. 63 bis 65.

ϑ) 100 ccm 10 %ige Rohrzuckerlösung
100 „ 1 %ige Kaliumpyruvinatlösung
10 g Hefe UM
20 ccm Chloroform.

Drehung im 2 dcm-Rohr entsprechend — 2,05 % Glucose.

b) Nach voraufgegangenem 2stündigen Stehen bei 37° 12stündige Aufbewahrung der Ansätze bei Zimmertemperatur (14 bis 17°).

α) 100 ccm 10 %ige Rohrzuckerlösung
100 „ H_2O
10 g Hefe OM
20 ccm Chloroform.

Drehung im 2 dcm-Rohr entsprechend — 1,70 % Glucose.

β) 100 ccm 10 %ige Rohrzuckerlösung
100 „ 2 m-Kaliumpyruvinatlösung
10 g Hefe OM
20 ccm Chloroform.

Drehung im 2 dcm-Rohr entsprechend — 1,80 % Glucose.

γ) 100 ccm 10 %ige Rohrzuckerlösung
100 „ H_2O
10 g Hefe XII
10 ccm Chloroform.

Drehung im 2 dcm-Rohr entsprechend — 1,75 % Glucose.

δ) 100 ccm 10 %ige Rohrzuckerlösung
100 „ m-brenztraubensaures Calcium
10 g Hefe XII
20 ccm Chloroform.

Drehung im 2 dcm-Rohr entsprechend — 1,95 % Glucose.

ε) 100 ccm 10 %ige Rohrzuckerlösung
100 „ H_2O
10 g Hefe UM
20 ccm Chloroform.

Drehung im 2 dcm-Rohr entsprechend — 1,85 % Glucose.

ζ) 100 ccm 10 $^0/_0$ige Rohrzuckerlösung
100 „ 2 m-brentraubensaures Kalium
10 g Hefe UM
20 ccm Chloroform.

Drehung im 2 dcm-Rohr entsprechend —1,95 $^0/_0$ Glucose.

η) 100 ccm 10 $^0/_0$ige Rohrzuckerlösung
100 „ H_2O
20 g Hefe K
10 ccm Chloroform

Drehung im 2 dcm-Rohr entsprechend —1,90 $^0/_0$ Glucose.

ϑ) 100 ccm 10 $^0/_0$ige Rohrzuckerlösung
100 „ 2 m-Kaliumpyruvinatlösung
20 g Hefe K
10 ccm Chloroform.

Drehung im 2 dcm-Rohr entsprechend —1,90 $^0/_0$ Glucose.

II. Wirkung von Invertase — Carboxylase in Hefesäften.

Temp. 28 ^{0}.

α) 50 ccm Saft U
50 „ 10 $^0/_0$ige Rohrzuckerlösung
10 „ H_2O.

Nach 15stündigem Stehen im Brutschrank bei 28 ^{0} wurde in der Siedehitze (Wasserbad) das Eiweiß koaguliert und abfiltriert. Das goldgelbe klare Filtrat[1]) drehte im 2 dcm-Rohr entsprechend + 2,10 $^0/_0$ Glucose.

β) 50 ccm Saft U
50 „ 10 $^0/_0$ige Rohrzuckerlösung
10 „ 10 $^0/_0$ige Kaliumpyruvinatlösung.

Nach 25stündiger Digestion im Brutschrank enteiweißt. Die Drehung im 2 dcm-Rohr entsprach +0,95 $^0/_0$ Glucose.

In 55 ccm Saft K wurden schnell
5,5 g Rohrzucker gelöst;
von dieser Mischung dienten je 25 ccm zu den 2 folgenden Versuchen γ) und δ).

[1]) Da es sich um Vergleiche handelt, spielt eine etwaige Eigendrehung des enteiweißten verdünnten Saftes keine Rolle.

γ) 25,0 ccm der $10^0/_0$igen Lösung von Rohrzucker in Saft K
2,0 „ H_2O
3,0 „ Toluol.

Nach 15stündiger Digestion bei 28^0 wurden 10,0 ccm H_2O hinzugefügt und im siedenden Wasserbade das Eiweiß auskoaguliert.

Drehung des klaren Filtrats im 2 dcm-Rohr entsprechend $+8{,}85^0/_0$ Glucose.

δ) 25,0 ccm der $10^0/_0$igen Lösung von Rohrzucker in Saft K
2,0 „ m-Kaliumpyruvinatlösung
3,0 „ Toluol.

Nach 15 Stunden wurden 10,0 ccm H_2O hinzugesetzt und nach Enteiweißung polarisiert.

Drehung im 2 dcm-Rohr entsprechend $+4{,}45^0/_0$ Glucose.

Die einschlägigen Versuche zeigen, daß die Wirkung der Invertase allem Anschein nach ganz unabhängig ist von der Carboxylase. Keinesfalls schädigt die Brenztraubensäure in Form ihrer Salze die Invertase[1]).

2. Einfluß von Zucker auf die Gärung der Brenztraubensäure.

Knüpft man an die mehrfach geäußerte Vorstellung an, daß die Carboxylase ein Teilenzym des Fermentkomplexes „Zymase" bildet, so besteht die Möglichkeit, daß bei gemeinsamer Vergärung größerer Mengen Zucker und Brenztraubensäure die Vergärungsrate beider Substanzen vermindert wird. Indem ein Teil der Carboxylase die zugefügte Brenztraubensäure umsetzt, wäre sie für die normale Zuckerspaltung nicht verfügbar, und umgekehrt könnte die beim Zuckerabbau tätige Carboxylase für die Zerlegung zugegebener Brenztraubensäure nur teilweise bereit sein. Diese Voraussetzungen haben nur eine Berechtigung, sofern Teilenzym und Fermentkomplex in korrelativen Mengen vorhanden sind. Obgleich über diesen Punkt zurzeit kaum eine Entscheidung möglich ist, haben wir

[1]) Anm. bei der Korr. Die gegenteilige Ansicht von M. Oppenheimer (Zeitschr. f. physiol. Chem. 93, 242) wird durch das Experiment widerlegt.

einige orientierende Experimente nach dieser Richtung ausgeführt. Zwei Versuche weisen darauf hin, daß eine derartige Beziehung vielleicht möglich ist; eine andere Schlußfolgerung wollen wir nicht ziehen.

Eine Verfolgung der Vorgänge durch Messung der entwickelten Kohlensäure schien wegen der möglichen wechselseitigen Stimulierung und wegen eines etwaigen Einflusses der Eigengärung nicht empfehlenswert. Wir wählten deshalb zur Feststellung des Grades der Brenztraubensäurezerlegung die Ermittlung des abgespaltenen Acetaldehyds und die Polarisation für die Erkennung der Zuckervergärung. Da es sich um Vergleichsversuche handelte, spielt die sekundäre Umwandlung des Acetaldehyds keine Rolle. Einer Verschleierung der Ergebnisse durch allmählichen Ausgleich versuchten wir durch eine Beschränkung der Gärdauer auf 4 Stunden bei 28° vorzubeugen. Zur Verwendung kam gepufferte m-Brenztraubensäure (8,8%ig) und 9%ige Fructose.

Versuch 1.

(Ausgeführt 1912.)

a) In ein Gemisch von 100,0 ccm 9%iger Fruchtzuckerlösung, 50,0 ccm 2 m-CH_3.CO.COOH und 50,0 ccm 2 m-K_2HPO_4 wurden 5 g Hefe D eingerührt.

1. Von der gleichmäßigen Suspension, deren Volumen 205 ccm betrug, wurden 20,0 ccm sofort entnommen und nach Zugabe von 2,0 ccm colloidaler Eisenhydroxydlösung filtriert.

Die Anfangsdrehung war im 1 dcm-Rohr entsprechend — 3,50% Glucose.

2. Nach 4stündiger Vergärung bei 28° wurden aus dem Sicherheitsrohr des Gärkolbens mittels Pipette wiederum 20,0 ccm der Mischung entnommen, und nach der gleichen Klärung war die Drehung auf den Wert = — 2,45% Glucose gesunken.

3. Während des Verweilens im Brutschrank war das Gärgefäß (Erlenmeyer-Kolben) mittels eines das Brutschrankdach durchdringenden Glasrohrs mit einem Kühler verbunden, der in eine außerhalb stehende geeiste Vorlage eintauchte[1]). In dieselbe

[1]) Vgl. die früher von C. Neuberg und L. Karczag (diese Zeitschr. 36, 71, 1911) und von C. Neuberg und J. Kerb (diese Zeitschr. 47, 410, 1912) beschriebenen Versuchsanordnungen, die entsprechend modifiziert wurden.

wurde alsdann auch der Acetaldehyd, der sich im Gärkolben befand, unter allen Vorsichtsmaßregeln übergetrieben. Das Destillat wurde nochmals über Calciumcarbonat rektifiziert. Der Gehalt an Aldehyd wurde alsdann titrimetrisch nach Ripper-von Fürth ermittelt. Gefunden wurden in dieser unvollständig vergorenen Mischung im ganzen 0,0120 g Acetaldehyd. Der Einfachheit halber sind die 2mal entnommenen Proben von je 20 ccm nicht berücksichtigt, da in den Vergleichsversuchen ebenso verfahren wurde.

β) Gleichzeitig wurden 100 ccm 9%ige Fruchtzuckerlösung mit 50,0 ccm m-K_2HPO_4 und 50 ccm m-K_2HPO_4 und 5 g Hefe D angesetzt. Anfangsdrehung unter den bei *α*) gewählten Bedingungen entsprechend — 3,50% Glucose. Nach 4stündiger Gärung bei 28° Drehungsabfall auf — 2,05%.

γ) Aus dem Gemisch von 50,0 ccm 2 m-$CH_3.CO.COOH$ und 50,0 ccm 2 m-K_2HPO_4, 100 ccm Leitungswasser und 5 g Hefe D wurden sofort 20,0 ccm entnommen und die gleiche Menge nach 4stündiger Vergärung bei 28°. Die durch Titration gefundene Menge Acetaldehyd betrug 0,0188 g.

Versuch 2.

(Ausgeführt 1912.)

Die 3 Ansätze *α*), *β*) und *γ*) wurden genau wie bei Versuch I gemacht, jedoch unter Verwendung der Hefe II.

α) Kombinationsansatz:

1. Anfangsdrehung entsprechend: — 3,55% Glucose.
2. Drehung nach 4stündiger Vergärung bei 28°: — 2,05% Glucose.
3. Aldehydmenge: 0,0184 g.

β) Ansatz mit Fructose.

1. Drehung zu Anfang entsprechend: — 3,50% Glucose.
2. Drehung nach 4stündiger Vergärung: — 1,70% Glucose.

γ) Ansatz mit gepufferter Brenztraubensäure.

Aldehydmenge: 0,0260 g.

Versuch 3.

(Ausgeführt 1913.)

Die Ansätze α), β) und γ) ebenso wie bei Versuch I und II, aber mit Hefe OM.

α) Kombinationsansatz.

1. Anfangsdrehung entsprechend: — 3,55 % Glucose.
2. Drehung nach 4 stündiger Vergärung bei 28°: — 2,15 % Glucose.
3. Drehung nach 8 stündiger Vergärung bei 28°: — 0,65 % Glucose.
4. Aldehydmenge: 0,0090 g.

β) Ansatz mit Fruchtzucker.

1. Drehung im Anfang entsprechend: — 3,55 % Glucose.
2. Drehung nach 4 stündiger Vergärung bei 28°: — 2,35 % Glucose.
3. Drehung nach 8 stündiger Vergärung bei 28°: — 0,70 % Glucose.

γ) Ansatz mit gepufferter Brenztraubensäure.
Aldehydmenge: 0,0054 g.

Versuch III läßt im Gegensatz zu Versuch I und II eher einen umgekehrten Einfluß von Zucker auf die Gärung der Brenztraubensäure erkennen. In den beiden ersten Fällen besteht er unter den gewählten Konzentrationen in einer gegenseitigen Hemmung der Carboxylase und Zymase. Es offenbart sich kein fördernder Einfluß auf die Zuckervergärung, den unter anderen Bedingungen (s. S. 75 und S. 83) die Zusätze kleiner Mengen von Salzen der Brenztraubensäure und anderer Ketosäuren auf die Spaltung der Hexosen ausüben. Für die Aldehydbildung aus Brenztraubensäure sind die Verhältnisse ungünstig; auf die kleinen Werte kann kein besonderes Gewicht gelegt werden. Erhöht man die Hefenmengen oder dehnt man die Gärung länger aus, so steigt zwar die Aldehydausbeute, aber zugleich wird der Zucker zu schnell umgesetzt[1]).

[1]) Versuche mit Hefesäften haben wir nicht angestellt in Rücksicht auf die Bearbeitung dieser Frage durch W. Palladin, N. Gromoff und N. N. Monteverde (diese Zeitschr. 62, 145, 1913); die von diesen Autoren unter anderen Bedingungen erzielten Resultate stehen mit unseren Befunden im Einklange.

3. Einfluß von Brenztraubensäure auf die Gärung verschiedener Zucker.

I. Schädigender Einfluß von freier Brenztraubensäure auf die Wirkung der Gärungsfermente Carboxylase und „Zymase“.

Die Tatsache, daß die freie Brenztraubensäure durch Carboxylase schlechter vergoren wird als die gepufferte (s. S. 25 bis 49) deutet darauf hin, daß das Ferment durch die Ketosäure eine Schädigung erfährt. Welcher Art dieselbe ist, läßt sich vorläufig nicht angeben. Es liegt nahe, die Beeinträchtigung mit der außerordentlichen Stärke der Brenztraubensäure in Zusammenhang zu bringen, die in der Dissoziationskonstanten dieser Säure $5{,}6 \times 10^{-1}$ zum Ausdruck kommen. Die entsprechenden Werte für Milchsäure und Propionsäure sind $1{,}38 \times 10^{-4}$ bezw. $1{,}34 \times 10^{-5}$. Kaum ist jedoch die Wasserstoffionenkonzentration der allein ausschlaggebende Faktor für die Wirkung der Säuren auf Hefen[1]).

Ganz losgelöst von allen theoretischen Ansichten läßt sich durch die folgende Versuchsanordnung die Schädigung der Carboxylase durch freie Brenztraubensäure einwandfrei beweisen.

Verschiedene Hefen, darunter auch eine Trockenhefe, wurden einmal mit der zehnfachen Menge 2%iger, vorher sterilisierter Traubenzuckerlösung, das andere Mal mit 2%iger Brenztraubensäurelösung[2]) 24 bis 48 Stunden lang bei 37° zur Gärung angestellt. Das Gärgut wurde sodann auf der Zentrifuge abgeschleudert und der Rückstand zweimal mit der zehnfachen Menge physiologischer Kochsalzlösung gründlich aufgerührt und wiederum abzentrifugiert. Der so ausgewaschene Rückstand wurde in einer bestimmten Menge Wasser aufgeschwemmt, und von der gleichmäßigen Suspension dienten aliquote Teile zu den Gärversuchen, die vergleichsweise mit

---

[1]) Siehe hierzu C. Neuberg u. L. Czapski, diese Zeitschr. **67**, 51, 1914, u. W. Kopaczewski, Internat. Zeitschr. f. Physiol. Chem. u. Biolog. **1**, 420, 1914.

[2]) Eine 2%ige Brenztraubensäurelösung ist = n/4,4; schon früher haben C. Neuberg und L. Czapski (diese Zeitschr. **67**, 53) festgestellt, daß die Gegenwart von n/5 bis n/3,3 — $CH_3.CO.COOH$ die Vergärung von Traubenzucker durch Ober- und Unterhefen aufhebt, selbst wenn reichlich Hefe (6 g auf 100 ccm 10%ige Glucoselösung) zugegen ist.

Traubenzucker, Rohrzucker und gepufferter Brenztraubensäure angestellt wurden. Die mit Traubenzucker vorbehandelten Hefen werden im folgenden als Zuckerhefen, die mit Brenztraubensäure vorbehandelten als Brenztraubensäurehefen bezeichnet werden.

Übereinstimmend ergeben die Versuche, die Herr Dr. Schwenck mitbearbeitet hat, daß bei den Brenztraubensäurehefen jegliche Gärkraft erloschen ist, während die Zuckerhefen fast normale Wirksamkeit entfalten.

Versuch 1.

Je 40 g Hefe XII wurden 48 Stunden lang mit 400 ccm 2 % iger Traubenzuckerlösung und mit 400 ccm 2 % iger Brenztraubensäurelösung bei 37° stehen gelassen und dann wie vorstehend behandelt. Der zentrifugierte Hefenrückstand wurde in 150 ccm Wasser aufgeschwemmt. Je 6 ccm der gleichmäßigen Suspension wurden mit 10 ccm einer 14,4 % igen Glucose- bezw. Rohrzuckerlösung bezw. mit einer nach erfolgter Pufferung molekularen Brenztraubensäurelösung versetzt.

Zeit in Stunden	Entwickelte ccm CO_2 mit					
	Zuckerhefe aus			Brenztraubensäurehefe aus		
	Glucose	Rohrzucker	gepuff. Brenztraubensäure	Glucose	Rohrzucker	gepuff. Brenztraubensäure
1,75	0,5	0,5	0,5	0	0	0
2,50	2,5	1,5	2,5	0	0	0
5,00	11,0	11,0	8,0	0	0	0
16,00	—	—	11,0	0	0	0

Versuch 2.

Ebenso wie Versuch 1, jedoch 48 stündige Digestion der Oberhefe OM mit der Zucker- bez. Brenztraubensäurelösung.

Zeit in Stunden	Entwickelte ccm CO_2 mit					
	Zuckerhefe aus			Brenztraubensäurehefe aus		
	Glucose	Rohrzucker	gepuff. Brenztraubensäure	Glucose	Rohrzucker	gepuff. Brenztraubensäure
1,0	2,5	2,5	0,0	0	0	0
2,0	10,0	11,0	0,3	0	0	0
4,5	11,0	—	2,0	0	0	0
15,5	—	—	11,0	0	0	0

Versuch 3.

36stündige Vergärung mit Hefe UM, sonst wie in den vorstehenden Versuchen.

Zeit in Stunden	Entwickelte ccm CO_2 mit Zuckerhefe aus			Brenztraubensäurehefe aus		
	Glucose	Rohrzucker	gepuff. Brenztrauben säure	Glucose	Rohrzucker	gepuff. Brenztraubensäure
0,5	0,5	0,5	0	0	0	0
2,0	11,0	11,0	0,2	0	0	0
14,5	—	—	6	0	0	0

Versuch 4.

Entsprechend Versuch 3 mit Unterhefe U.

Zeit in Stunden	Entwickelte ccm CO_2 mit Zuckerhefe aus			Brenztraubensäurehefe aus		
	Glucose	Rohrzucker	gepuff. Brenztraubensäure	Glucose	Rohrzucker	gepuff. Brenztraubensäure
0,5	1,0	0	0	0	0	0
2,0	Spur	Spur	0	0	0	0
14,5	1,0	1,0	1,0	0	0	0

Wie man sieht, war in Versuch 4 die Zuckerhefe auch schon stark geschädigt worden.

Versuch 5.

Es wurde deshalb dieselbe Hefe nochmals in der gleichen Weise angestellt, aber nurmehr 24 Stunden der Einwirkung der 2 %igen Lösung von Zucker und freier Brenztraubensäure ausgesetzt.

Zeit in Stunden	Entwickelte ccm CO_2 mit Zuckerhefe aus			Brenztraubensäurehefe aus		
	Glucose	Rohrzucker	gepuff. Brenztraubensäure	Glucose	Rohrzucker	gepuff. Brenztraubensäure
1,0	0,5	0,5	Spur	0	0	0
3,0	11,0	11,0	8,0	0	0	0
15,5	—	—	11,0	0	0	0

Versuch 6.

15 g Trockenhefe S wurden mit den 2 %igen Lösungen 24 Stunden im Brutschrank digeriert usw. Ansätze wie zuvor beschrieben.

Zeit in Stunden	Entwickelte ccm CO_2 aus: Zuckerhefe aus Glucose	Zuckerhefe aus Rohrzucker	Zuckerhefe aus gepuff. Brenztraubensäure	Brenztraubensäurehefe aus Glucose	Brenztraubensäurehefe aus Rohrzucker	Brenztraubensäurehefe aus gepuff. Brenztraubensäure
1,0	Spur	Spur	Spur	0	0	0
3,0	0,2	0,2	Spur	0	0	0
15,5	0,8	0,8	Spur	0	0	0

Die mitgeteilten Versuche tun in ganz eindeutiger Weise dar, daß freie Brenztraubensäure unter den gegebenen Bedingungen die Tätigkeit der Carboxylase und der „Zymase" völlig aufhebt und selbst eine Fähigkeit der vorbehandelten Hefen zur Selbstgärung beseitigt. Dabei sind die Mengen Brenztraubensäure, die diese Wirkung entfalten, gering; sie betragen 400 ccm der 2 %igen Lösung auf 40 g Hefe.

Der Effekt ist nur der freien Brenztraubensäure eigen; gepufferte Brenztraubensäure ist wirkungslos. 2 %ige Brenztraubensäure, die durch Moderatoren abgestumpft ist, beeinflußt die vorbehandelte Hefe nicht anders als 2 %ige Traubenzuckerlösung, ja sie schädigt die „Zymase" weniger als die Vorbehandlung mit Zucker. Gründe dafür sind vorläufig nicht anzugeben. Es ist zu bedenken, daß bei der 48stündigen Vorbehandlung ja nicht nur das Substrat direkt zu wirken braucht, sondern daß es auch mittelbar in den natürlichen Ablauf des Lebens- und Generationswechsels der Hefenzellen eingreifen kann.

Die tabellarisch (s. S. 74) wiedergegebenen Versuche sind so angestellt, daß sie einen vollständigen Vergleich der Verhältnisse bei nativer Hefe (d) und bei mit freier (a) und phosphatgepufferter (b) Brenztraubensäure sowie bei mit Traubenzucker (c) vorbehandelter Hefe ermöglichen.

Zur Verwendung gelangte Hefe OM.

a) 40 g Hefe OM wurden 48 Stunden mit 400 ccm 2 %iger freier Brenztraubensäure bei 37° digeriert.

b) 40 g derselben Hefe wurden mit der Auflösung von 8 g Brenztraubensäure und 15,8 g K_2HPO_4 in 400 ccm Wasser 48 Stunden bei 37° vorbehandelt.

c) 40 g derselben Hefe wurden mit 400 ccm 2 %iger Glucoselösung gleichzeitig digeriert.

Sodann wurde das Gärgut sämtlicher 3 Ansätze zentrifugiert; der Bodensatz mit 400 ccm physiologischer Kochsalzlösung gut angerührt und wieder abgeschleudert. Nach Wiederholung der Prozedur wurde der gewaschene Rückstand mit 150 ccm Wasser zu einer gleichmäßigen Suspension verrührt.

d) Eine ebensolche Aufschwemmung wurde aus 40 g frischer Hefe OM mit 150 ccm Wasser bereitet.

Nunmehr wurden je 6 ccm jeder Suspension mit 10 ccm einer 9 %igen Traubenzucker- bzw. Rohrzuckerlösung bzw. mit 10 ccm des Gemisches von gleichen Teilen 2 m-$CH_3 \cdot CO \cdot COOH$ und 2 m-K_2HPO_4 versetzt.

In den einzelnen Ansätzen entwickelten sich folgende Mengen Kohlensäure in ccm.

Zeit in Stunden	a			b			c			d		
	Brenztraubensäurehefe			Hefe vorbeh. mit gepufferter Brenztraubensäure			Zuckerhefe			Ursprüngliche Hefe		
	Glucose	Rohrzucker	Gepufferte Brenztraubensäure	Glucose	Rohrzucker	Gepufferte Brenztraubensäure	Glucose	Rohrzucker	Gepufferte Brenztraubensäure	Glucose	Rohrzucker	Gepufferte Brenztraubensäure
1,25	0	0	0	11	11	0,3	Spur	Spur	0,2	11	11	4
3	0	0	0	—	—	3,0	0,2	0,5	2,0	—	—	6
4	0	0	0	—	—	4,0	0,5	2,5	3,5	—	—	8
4,75	0	0	0	—	—	5,0	0,8	5,0	5,0	—	—	9
7	0	0	0	—	—	8,0	4,0	11,0	9,0	—	—	10
18	0	0	0	—	—	10,0	11,0	—	11,0	—	—	11

In besonderen Versuchen wurde festgestellt, daß eine Vorbehandlung der Hefe mit einem Gemisch von Mono- und Di-kaliumphosphat, dessen PO_4-Gehalt dem der phosphatgepufferten Brenztraubensäurelösung gleich war, auf die Gärkraft der Hefe gegenüber Zucker und Brenztraubensäure nur eine schwach verzögernde, aber keine schädigende Wirkung ausübt.

Die von uns schon früher[1]) abgeleitete Schlußfolgerung, daß

[1]) C. Neuberg und L. Karczag, diese Zeitschr. 36, 76, 1911.

freie Brenztraubensäure die Carboxylase beeinträchtige, konnte somit auf einem neuen Wege bestätigt werden.

II. Fördernder Einfluß von kleinen Mengen brenztraubensaurer Salze auf die Gärung verschiedener Zucker.

Wir haben zuvor (siehe S. 8) mitgeteilt, daß mit 60% Rohrzucker zwecks Konservierung versetzter Macerationssaft seine Gärwirkung einstellt, bevor sämtlicher Zucker umgesetzt ist. Ein solcher ruhender Saft entwickelte nun mit verdünnter gepufferter Brenztraubensäure sehr viel reichlicher Kohlendioxyd als eine nicht gezuckerte und nur durch Kälte konservierte Probe des gleichen Saftes. Da an sich die Carboxylase in der Kälte sehr widerstandsfähig ist, so deutete das geschilderte Verhalten auf eine Hineinbeziehung des Zuckers in den Gärungsverlauf, auf eine Stimulierung der Hexosengärung durch die gepufferte Brenztraubensäure. Auf die gleiche Wirkung der Pyruvinate wiesen die Ergebnisse hin, die bei den Versuchen über den Einfluß der Brenztraubensäure auf die Invertasewirkung (s S. 62 bis 66) zutage treten. Kalium- sowie Calciumpyruvinat wirkten gar nicht oder fördernd auf die Inversion des Rohrzuckers durch die Hefeninvertase ein und steigerten die Vergärung des gebildeten Invertzuckers um mehr als 100%.

Dieses Verhalten ließ uns an Beziehungen zum Co-Ferment denken, die in einer besonderen Untersuchung tatsächlich zutage getreten sind (s. S. 135).

Aktivierende Einflüsse von organischen Säuren und deren Salzen in geringer Konzentration auf den Ablauf der alkoholischen Gärung sind schon mehrfach festgestellt. So zeigten H. v. Euler und H. Cassel[1]), daß Formiate, Lactate und Tartrate, namentlich die entsprechenden Ammonium- und Natriumsalze als kräftige Katalysatoren der alkoholischen Gärung dienen können. Für Alkalisalze der Oxalsäure, Weinsäure und Zitronensäure haben ferner Herr und Frau Rosenblatt[2])

---

[1]) H. v. Euler und H. Cassel, Zeitschr. f. physiol. Chem. 86, 123, 1913.

[2]) M. und Mme Rosenblatt, Annales de l'Inst. Pasteur. 1914, Juli-Nr., S. 714.

ein ähnliches Aktivierungsvermögen beobachtet. Nicht unerwähnt bleibe, daß W. Zaleski[1]) bereits darauf hingewiesen hat, daß die Stimulierungen der CO_2-Produktion verschiedener Pflanzen durch Hefanolextrakte — sie enthalten das Ko-Ferment — und durch Brenztraubensäure oder besser durch Alkalipyruvinate parallel gehen.

Es scheint physiologisch besonders bemerkenswert, daß sich das Aktivierungsvermögen nicht auf die Pyruvinate beschränkt; es kommt auch den Salzen der übrigen aliphatischen und aromatischen Ketosäuren zu (siehe S. 83). Diese Katalysatoren entfalten ihre Wirkung auf die 3 gärungsfähigen Hexosen par excellence (Glucose, Fructose, Mannose) und auch auf solche Disaccharide, die leicht hydrolysiert werden (Rohrzucker, Maltose)[2]).

Unsere erwähnten Beobachtungen, die uns zu einer Beschäftigung mit der Aktivierungsfrage führten, waren bei Versuchen mit Hefensäften gemacht. Wir bedienten uns deshalb weiter desselben Fermentmaterials.

Da die Aktivierung naturgemäß am stärksten zu Anfang der Versuche zutage tritt, konnten wir uns in den meisten Fällen auf kurzfristige Versuche in kleinen Eudiometern mit Quecksilberverschluß beschränken. In diesen Fällen erwies sich auch der Zusatz eines Antisepticums als unnötig.

Es kamen jedesmal zur Anwendung 1. 15,0 ccm Saft, der mit 1,5 ccm $^m/_2$-Hexosenlösung[3]) ($9\,^0/_0$ig) und 0,15 ccm m- oder

---

[1]) W. Zaleski, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. **31**, 349 u. 354, 1913.

[2]) In der Beschreibung der Pyruvinatwirkung auf die Vergärung von Traubenzucker ist uns M. Oppenheimer in einer jüngst in der Zeitschr. f. physiol. Chem. (93, 235) erschienenen Mitteilung zuvorgekommen. Dem Autor kommt also die Priorität dieser Entdeckung zu. Von keiner Seite liegen jedoch Angaben darüber vor, daß die Erscheinung durch die Salze aller physiologisch wichtigen Ketosäuren hervorgerufen wird und daß sich diese Aktivierungen auch auf alle hauptsächlich gärfähigen Hexosen erstrecken. Unsere über mehrere Jahre sich ausdehnenden und in der Publikation verspäteten Untersuchungen decken somit eine neue und allem Anscheine nach allgemeine Beziehung der α-Ketosäuren und damit des Aminosäurenstoffwechsels zur alkoholischen Gärung auf (s. S. 83 u. 138).

[3]) bezw. $^m/_4$-Disaccharidlösung.

$^m/_{10}$-Kaliumpyruvinatlösung gemischt war. Zum Vergleich diente 2. die Mischung von 15,0 ccm Saft mit 1,5 ccm $^m/_2$-Hexosenlösung allein und 3. zur Kontrolle das Gemisch von 15,0 ccm Saft und 0,15 ccm m- bezw. $^m/_{10}$-Kaliumpyruvinat. Nachdem sich herausgestellt hatte, daß die aus der angewandten Pyruvinatmenge und den Salzen anderer Ketosäuren in Freiheit gesetzte Kohlensäure vernachlässigt werden konnte, entfiel die Kontrolle 3.

Säfte, die Traubenzucker erst nach Stunden zu vergären anfingen, wurden ausgesondert.

Temp. 28°.

α) 15,0 ccm Saft K
1,5 „ $^m/_2$-Glucoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	1	3,5	5	7

β) 15,0 ccm Saft K
1,5 „ $^m/_2$-Glucoselösung
0,15 „ m-Kaliumpyruvinat.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	2	5	6	7,5

γ) 15,0 ccm Saft K
1,5 „ H_2O
0,15 „ m-Kaliumpyruvinat.

Nach 24^h: 0,25 ccm CO_2.

δ) 15,0 ccm Saft K
1,5 „ H_2O.

Nach 24^h: 0 ccm.

ε) 15,0 ccm Saft K
1,5 „ $^m/_2$-Fructoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	1	2,5	3,5	4,5

ζ) 15,0 ccm Saft K
1,5 „ $^m/_2$-Fructoselösung
0,15 „ m-Kaliumpyruvinat.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	5	6	7	7,5

η) 15,0 ccm Saft S[1])
1,5 " $^m/_2$-Glucoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	2	5	5,5	6

ϑ) 15,0 ccm Saft S
1,5 " $^m/_2$-Glucoselösung
0,15 " m-Kaliumpyruvinat.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	2,5	5,5	6	6,5

ι) 15,0 ccm Saft S
1,5 " $^m/_2$-Mannoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	1	2,5	4,25	5

κ) 15,0 ccm Saft S
1,5 " $^m/_2$-Mannoselösung
0,15 " $^m/_{10}$-Kaliumpyruvinat.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	4	6	7	7,5

λ) 15,0 ccm Saft UM[2])
1,5 " $^m/_2$-Glucoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	0	0	0	1,5

(Gor in feinen Bläschen.)

μ) 15,0 ccm Saft UM
1,5 " $^m/_2$-Glucoselösung
0,15 " m-Kaliumpyruvinat.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	1	2	3,5	6

(Gor in großen Perlen.)

---

[1]) Die Selbstgärung des Saftes S und der übrigen Säfte, die im folgenden benutzt werden, war innerhalb der Versuchszeiten absolut 0. Eine Stimulierung derselben durch Pyruvinatlösung war in der Regel nicht zu beobachten, gegebenenfalls ist sie besonders angeführt.

[2]) Die Selbstgärung von 15 ccm Saft UM + 1,5 ccm H_2O war auch in $24^h = 0$, in 36^h = Spur.

15 ccm Saft UM + 1,5 ccm H_2O + 0,15 ccm m-Kaliumpyruvinatlösung entwickelten in 1^h eine Spur, in 2^h 0,3 ccm CO_2.

ν) 15,0 ccm Saft OM
1,5 „ m/2-Galactoselösung
3,0 „ Toluol[1]).

Entw. ccm CO_2 nach	10 h	24 h	48 h	72 h
	0	2	5	5,5

ξ) 15,0 ccm Saft OM
1,5 „ m/2-Galactoselösung
0,15 „ m/10-Kaliumpyruvinat
3,0 „ Toluol.

Entw. ccm CO_2 nach	10 h	24 h	48 h	72 h
	0	2	5	5,5

ο) 15,0 ccm Saft S
1,5 „ m/4-Saccharoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	2	3	4,5	6,5

π) 15,0 ccm Saft S
1,5 „ m/4-Saccharoselösung
0,15 „ m/10-Kaliumpyruvinat.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	1	2	4	6

ϱ) 15,0 ccm Saft UM
1,5 „ m/4-Saccharoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	1,5	3,5	5	7

ς) 15,0 ccm Saft UM
1,5 „ m/4-Saccharoselösung
0,15 „ m-Kaliumpyruvinat.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	4,5	5,5	6,5	8

τ) 15,0 ccm Saft UM
1,5 „ m/4-Maltoselösung

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′	2 St.
	0	0	Spur	1	2,5

---

[1]) Auch ohne Beigabe von Toluol war innerhalb 10 Stunden in einem anderen Ansatz mit denselben Materialien keine Gärung zu beobachten.

v) 15,0 ccm Saft UM
1,5 „ $^m/_4$-Maltoselösung
0,15 „ m-Kaliumpyruvinat.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′	2 St.
	0,3	2	3	4	7

Temp. 38°.

α) 15,0 ccm Saft K
1,5 „ $^m/_2$-Glucoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	3,5	5	6,5	7,5

β) 15,0 ccm Saft K
1,5 „ Glucoselösung
0,15 „ m-Kaliumpyruvinat.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	4	7	7,5	8

γ) 15,0 ccm Saft S
1,5 „ $^m/_2$-Glucoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	2,7	6	7	7,5

δ) 15,0 ccm Saft S
1,5 „ 9 %ige Glucoselösung
0,15 „ m-Kaliumpyruvinat.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	5	8	8,5	8,5

ε) 15,0 ccm Saft K
1,5 „ $^m/_2$-Fructoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	3,5	5,5	6,5	8

ζ) 15,0 ccm Saft K
1,5 „ $^m/_2$-Fructoselösung
0,15 „ $^m/_{10}$-Kaliumpyruvinat.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	4	6,5	7	9

η) 15,0 ccm Saft UM
1,5 „ $^{m}/_{2}$-Mannoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	1,5	3	4	5,5

ϑ) 15,0 ccm Saft UM
1,5 „ $^{m}/_{2}$-Mannoselösung
0,15 „ m-Kaliumpyruvinat.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	3	4	5	6

ι) 15,0 ccm Saft S
1,5 „ $^{m}/_{2}$-Mannoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	2	3,75	5,75	8

κ) 15,0 ccm Saft S
1,5 „ $^{m}/_{2}$-Mannoselösung
0,15 „ $^{m}/_{10}$-Kaliumpyruvinat.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	5	6,5	7,5	8,5

λ) 15,0 ccm Saft S
1,5 „ $^{m}/_{4}$-Saccharoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	2,5	3,5	6,5	7

μ) 15,0 ccm Saft S
1,5 „ $^{m}/_{4}$-Saccharoselösung
0,15 „ m-Kaliumpyruvinat.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	6	7	7,75	8

ν) 15,0 ccm Saft K
1,5 „ $^{m}/_{4}$-Saccharoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach . . .	15′	30′	45′	60′	2 h
	1	3	5	6	8,5

ξ) 15,0 ccm Saft K
1,5 „ $^{m}/_{4}$-Saccharoselösung
0,15 „ m-Kaliumpyruvinat.

Entw. ccm CO_2 nach . . .	15′	30′	45′	60′	2 h
	5	6	7	8,	8,5

Schließlich sind noch einige Versuche angeführt, die sich auf längere Zeiten erstrecken. Das Bild ändert sich dabei, wie zu erwarten war, nicht. Diese Versuche wurden so durchgeführt, daß immer je zwei Azotometer beschickt wurden. Das erste (A) enthielt 15,0 ccm Saft S und 1,5 ccm einer $^{m}/_{2}$-Glucose- bzw. Fructose- oder Mannoselösung; das zweite wurde mit 15,0 ccm Saft S, 1,5 ccm der entsprechenden Zuckerlösung und 0,15 ccm einer $^{m}/_{10}$-Kaliumpyruvinatlösung gefüllt. Die Gärungen wurden bei 28° im Brutschrank stets unter Beigabe von 1,5 ccm Toluol angesetzt.

o) Versuch mit Glucose.

Gemessene Menge Kohlensäure in ccm.

Zeit in Stunden	Versuch	
	A	B
0,25	0	3,9
0,5	1,4	7,6
0,75	3,2	9,6
1,0	5,8	11,6
1,5	8,4	13,6
3,5	17,8	19,2
19,5	20,4	21,4

π) Versuch mit Fruchtzucker (Fructose).

Gemessene Menge Kohlensäure in ccm

Zeit in Stunden	Versuch	
	A	B
0,25	Spuren	4,0
0,5	3,0	7,4
0,75	5,6	10,0
1,0	6,8	10,8
3,0	15,2	16,8
6,5	18,9	18,8
20,5	22,4	22,2

ϱ) Versuch mit Mannose.

Gemessene Menge Kohlensäure in ccm.

Zeit in Stunden	Versuch	
	A	B
0,25	0,6	1,8
0,5	3,8	5,0
0,75	5,4	6,4
2,5	15,2	15,0
6,0	18,0	20,0
20,0	21,2	22,1

Fast durchgehends[1]) tritt in den erwähnten Versuchen der

[1]) Gelegentlich sind wir Säften begegnet, deren zymatische Kraft durch Pyruvinat in dem angegebenen Verhältnis in keiner Weise gesteigert, ja bei Einwirkung auf Fruchtzucker sogar ein wenig gehemmt wurde. Vielleicht ist in diesen Fällen so viel natürlicher Aktivator vorhanden, daß keine Steigerung mehr möglich ist.

Aktivierungseffekt der Pyruvinate auf die drei Hauptvertreter der Hexosen und den Rohrzucker zutage. Am deutlichsten bei 28°, etwas schwächer bei 37°. Unbeeinflußt scheint — soweit bisher festgestellt wurde — nur die Gärung der d-Galactose[1]) zu bleiben. Das erscheint erklärlich, wenn man bedenkt, daß dieser Zucker überhaupt nur langsam vergoren wird und daß die Stimulierung nur in der ersten Vergärungszeit deutlich ist und allmählich absinkt. Vermutlich werden auch bei längerer Gärdauer die im Pyruvinat gelegenen aktivierenden Faktoren verbraucht, ähnlich dem Ko-Ferment der Zymase. Da ja die Pyruvinate der Zerlegung durch die Carboxylase anheimfallen und die Spaltprodukte weiter umgewandelt werden, so hängt wohl die ganze Erscheinung mit den Vorgängen bei der zuckerfreien Gärung zusammen.

4. Einfluß von Salzen höherer Ketosäuren auf die Gärung verschiedener Zuckerarten.

(Über eine unmittelbare Beziehung des Aminosäurenstoffwechsels zur Gärung.)

Mit der Brenztraubensäure teilen die homologen α-Ketosäuren und die α-Ketodicarbonsäuren die Befähigung zur zuckerfreien Gärung. Nachdem nun für die brenztraubensauren Salze ein stimulierender Einfluß auf die Vergärung des Traubenzuckers, der Fructose und Mannose usw. erkannt war, lag es nahe, die höheren Ketosäuren auf ein entsprechendes Aktivierungsvermögen zu prüfen. Ein solches ist in ausgesprochenem Maße vorhanden und mindestens so stark wie bei der Brenztraubensäure entwickelt. Geprüft und wirksam befunden wurden die α-Ketobuttersäure, die α-Ketocapronsäure (Methyl-äthyl-brenztraubensäure), die Oxybrenztraubensäure, die Oxalessigsäure (α-Ketobernsteinsäure), die α-Ketoglutarsäure, die Phenylglyoxalsäure, die Phenylbrenztraubensäure und die Oxyphenylbrenztraubensäure. Wie sich die Brenztraubensäure vom Alanin ableitet, so sind

[1]) Die Vergärung des hexosediphosphorsauren Calciums konnte durch einen Zusatz von Kaliumpyruvinat gleichfalls nicht beeinflußt werden, ebenso ist — wie zu erwarten stand — bisher keine Einwirkung auf Milchzucker zu beobachten gewesen.

auch die andern Ketosäuren Derivate von Aminosäuren, und zwar der Aminobuttersäure, des Isoleucins, des Serins, der Asparaginsäure, der Glutaminsäure, des Phenyglykokolls, Phenylalanins und Tyrosins. Es kann als wahrscheinlich gelten, daß die anderen, vorläufig nicht geprüften α-Ketosäuren ebenso wirken.

Der chemische Charakter und das biologische Verhalten dieser Gruppe von Aktivatoren legt den Gedanken nahe, daß sich hier eine natürliche Beziehung zwischen den Vorgängen der alkoholischen Gärung, der zuckerfreien Gärung und des Eiweißumsatzes neu enthüllt. Beim normalen Vorgange, der Zuckervergärung durch lebende Hefen, geht ein Teil der Zellen zugrunde. Ihr Eiweiß unterliegt proteolytischem Abbau und die gebildeten Aminosäuren werden — solange Zucker zugegen ist — von den lebenden Hefenzellen wieder verarbeitet, wobei einerseits Fuselöl entsteht und andererseits das freigewordene Ammoniak in den Kreislauf des Eiweißes zurückkehrt (F. Ehrlich). Diese scheinbar einfache Umwandlung der Aminosäuren ist jedoch ein verwickelter Prozeß, keine glatte Desaminierung und Aspaltung von CO_2. Es erfolgt vielmehr dieser Abbau der Aminosäuren — soweit bekannt, nur in Gegenwart von Zucker und durch lebende Hefezellen — über die α-Ketosäuren (O. Neubauer). Diese oxydativ gebildeten α-Ketosäuren sind dann direkt gärbar, da sie durch das Ferment Carboxylase auch in Abwesenheit von Zucker und durch zellfreie Enzympräparate in CO_2 und einen Aldehyd gespalten werden (C. Neuberg). Die Aldehyde werden dann sekundär ganz allgemein zu den entsprechenden Alkoholen (Neuberg) reduziert.

Genau so, wie die Zymase auch in der Natur nicht vorkommende Zucker angreift, wie die Fuselölbildung auch aus zellfremden Aminosäuren erfolgt, wie sich die zuckerfreie Gärung auch auf solche Ketosäuren erstreckt, die sich von „unnatürlichen“ Aminosäuren ableiten, und wie sicherlich organismenfremde Aldehyde reduziert werden, genau so greifen auch die Salze einiger unnatürlicher α-Ketosäuren in die Zuckergärung ein, indem sie deren Ablauf stimulieren. Nur das Faktum läßt sich vorläufig feststellen, nicht aber der Grund angeben. Die Wirkung scheint eine komplizierte zu sein.

Vergegenwärtigt man sich, daß bei der Vergärung des Zuckers durch zellfreie Säfte oder leblose Hefepräparate keine Umwandlung der Eiweißbausteine in α-Ketosäuren stattfindet, so eröffnet sich mit einem Schlage die Möglichkeit einer Beziehung der α-Ketosäuren zu dem Ko-Ferment. Letzteres erschöpft sich bei allen Gärungen mit leblosen Hefenpräparaten, nicht dagegen bei der Vergärung durch lebende Hefen, wo allem Anschein nach stets α-Ketosäuren gebildet werden. Diese selbst werden durch die Carboxylase alsbald zerlegt, also verbraucht. Freilich darf das Ko-Enzym nicht einfach mit einer Ketosäure oder einem Salz derselben identifiziert werden. Denn dann müßten Pyruvinate, die ja aus dem Zucker allein hervorgehen dürften, das Koferment ersetzen können. Das ist jedoch nicht der Fall. Eine Vielheit von α-ketosauren Salzen im Gemisch mit Phosphat hat jedoch deutlich eine koenzymähnliche Wirkung (s. S. 135).

Jedenfalls zeigen sich hier neue Zusammenhänge zwischen Gärung und Eiweißabbau; in gewissem Sinne dürfte es sich um eine Regulierung der gewöhnlichen Zuckergärung durch eine gleichzeitig verlaufende zuckerfreie Gärung handeln.

Stimulation der „Zymase" durch die Salze verschiedener höherer α-Ketosäuren.

Temp. 28°.

α) 15,0 ccm Saft K
1,5 " m/2-Glucoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	2	3	4	5

(Beginn der Gärung nach 6′.)

β) 15,0 ccm Saft K
1,5 " m/2-Glucoselösung
0,15 " m-Kalium-ketobutyrat.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	4,0	4,5	5,5	6,5

(Beginn der Gärung sofort.)

γ) 15,0 ccm Saft K
1,5 " m/2-Fructoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	2	3	5	6

δ) 15,0 ccm Saft K
1,5 " m/2-Fructoselösung
0,15 " m-ketobuttersaures Kalium.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	3,5	5	6	7

ε) 15,0 ccm Saft S
1,5 " m/2-Mannoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	0	0,75	2	4

ζ) 15,0 ccm Saft S
1,5 " m/2-Mannoselösung
0,15 " m-Kalium-ketobutyrat.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	1,5	3	4,5	5,5

η) 15,0 ccm Saft K
1,5 " m/4-Rohrzuckerlösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	1,5	3	4	4,5

ϑ) 15,0 ccm Saft K
1,5 " m/4-Saccharoselösung
0,15 " m-Kalium-ketobutyrat.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	3	4,5	5	6

ι) 15,0 ccm Saft S
1,5 " m/2-Glucoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach . . .	15′	30′	45′	60′	2h
	0,25	0,5	0,5	0,75	2

κ) 15,0 ccm Saft S
1,5 " m/2-Glucoselösung
0,15 " m-Kalium-ketobutyrat.

Entw. ccm CO_2 nach . . .	15′	30′	45′	60′	2h
	2,5	4,5	5,5	6,5	8

λ) 15,0 ccm Saft UM [1])
1,5 „ m/2-Glucoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach . . .	15′	30′	45′	60′	2h
	0,2	2	5	5,5	8

μ) 15,0 ccm Saft UM [1])
1,5 „ m/2-Glucoselösung
0,15 „ m-Kalium-ketocapronat.

Entw. ccm CO_2 nach . . .	15′	30′	45′	60′	2h
	2	4	6	6,5	8,5

ν) 15,0 ccm Saft UM [1])
1,5 „ m/2-Fructoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	1	2,5	3,5	5

ξ) 15,0 ccm Saft UM [1])
1,5 „ m/2-Fructoselösung
0,15 „ m-Kalium-ketocapronat.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	3	5	7	9

o) 15,0 ccm Saft UM [1])
1,5 „ m/2-Glucoselösung
0,15 „ m/2-Kalium-oxaloacetat (nicht ganz gelöst).

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	1,5	4,5	6	8

π) 15,0 ccm Saft UM [1])
1,5 „ m/2-Glucoselösung
0,15 „ m-oxybrenztraubensaures Ca.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	1,5	3	6,5	8,5

ϱ) 15,0 ccm Saft UM [1])
1,5 „ m/2-Fructoselösung
0,15 „ m-oxybrenztraubensaures Calcium.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	2,5	4,5	6	8

[1]) In den Versuchen λ bis φ ist dieselbe Saftprobe zur Anwendung gekommen; die Versuche sind also miteinander vergleichbar.

σ) 15,0 ccm Saft UM[1])
1,5 " $^{m}/_{2}$-Glucoselösung
0,15 " m-ketogluconsaures[2]) Calcium.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	1	3	6	6,5

τ) 15,0 ccm Saft UM[1])
1,5 " $^{m}/_{2}$-Glucoselösung
0,15 " $^{m}/_{10}$-phenylglyoxalsaures Kalium.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	1	3	5,75	7

υ) 15,0 ccm Saft UM[1])
1,5 " $^{m}/_{2}$-Glucoselösung
0,15 " $^{m}/_{10}$-phenylbrenztraubensaures K.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	1,5	5	7	9,5

φ) 15,0 ccm Saft UM[1])
1,5 " $^{m}/_{2}$-Fructoselösung
0,15 " $^{m}/_{10}$-phenylbrenztraubensaures K.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	3	6	9	11

χ) 15,0 ccm Saft UM
1,5 " $^{m}/_{2}$-Glucoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	0	1	2	4

ψ) 15,0 ccm Saft UM
1,5 " $^{m}/_{2}$-Glucoselösung
0,15 " $^{m}/_{10}$-oxyphenylbrenztraubensaures K.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	1	3	4	5,5

---

[1]) In den Versuchen λ bis φ ist dieselbe Saftprobe zur Anwendung gekommen; die Versuche sind also miteinander vergleichbar.

[2]) Vgl. C. Neuberg, diese Zeitschr. 28, 355, 1910. Diese Säure ist vielleicht die zur d-Glucosaminsäure gehörige α-Ketosäure; die isomere Glucuronsäure soll gelegentlich geprüft werden.

ω) 15,0 ccm Saft UM
1,5 " m/2-Glucoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	0	1	2,5	3

αα) 15,0 ccm Saft UM
1,5 " m/2-Glucoselösung
0,15 " m/20-ketoglutarsaures K.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	0	1,5	3,5	4,5

ββ) 15,0 ccm Saft UM
1,5 " m/2-Mannoselösung

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	Spur	0,5	2	3

γγ) 15,0 ccm Saft UM
1,5 " m/2-Mannoselösung
0,15 " m/20-ketoglutarsaures K.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	1	2,5	3,5	5

Temp. 37°.

α) 15,0 ccm Saft K
1,5 " m/2-Glucoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	3,5	5	6,5	7

β) 15,0 ccm Saft K
1,5 " m/2-Glucoselösung
0,15 " m-Kalium-ketobutyrat.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	6,5	7	8	8,5

γ) 15,0 ccm Saft K
1,5 " m/2-Fructoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	3	4	6	8

δ) 15,0 ccm Saft K
1,5 " m/2-Fructoselösung
0,15 " m-Kalium-ketobutyrat.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	5	6	7,5	9

ε) 15,0 ccm Saft S
1,5 „ $^m/_2$-Mannoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	0,25	2	5	7

ζ) 15,0 ccm Saft S
1,5 „ $^m/_2$-Mannoselösung
0,15 „ m-Kalium-ketobutyrat.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	3	5	6	8

η) 15,0 ccm Saft K
1,5 „ $^m/_4$-Saccharoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	3	5	7	8

ϑ) 15,0 ccm Saft K
1,5 „ $^m/_4$-Saccharoselösung
0,15 „ m-Kalium-ketobutyrat.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	4,5	5,5	8	9

ι) 15,0 ccm Saft UM
1,5 „ $^m/_4$-Maltoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	0	0	0,3	1

κ) 15,0 ccm Saft UM
1,5 „ $^m/_4$-Maltoselösung
0,15 „ m-ketobuttersaures Kalium.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	0,5	1	2	3

λ) 15,0 ccm Saft K
1,5 „ 9 %ige Glucoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach . . .	15′	30′	45′	60′	2h
	0,2	2	4	5	9

μ) 15,0 ccm Saft K
1,5 „ $^m/_2$-Glucoselösung
0,15 „ m-ketocapronsaures Kalium.

Entw. ccm CO_2 nach . . .	15′	30′	45′	60′	2h
	2	4	6	7	11

ν) 15,0 ccm Saft S[1])
1,5 „ m/2-Mannoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach . . .	15′	30′	45′	60′	2h
	0,5	2,5	4,5	6	8

ξ) 15,0 ccm Saft S[1])
1,5 „ m/2-Mannoselösung
0,15 „ m-ketocapronsaures K.

Entw. ccm CO_2 nach . . .	15′	30′	45′	60′	2h
	2,5	5,5	6,5	8	10

ο) 15,0 ccm Saft S
1,5 „ m/2-Mannoselösung
0,15 „ m/10-oxalessigsaures K.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	1	5	6,5	7,5

π) 15,0 ccm Saft S
1,5 „ m/2-Mannoselösung
0,15 „ m-oxybrenztraubensaures Ca.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	1,5	3	6	7

ρ) 15,0 ccm Saft K[2])
1,5 „ m/2-Glucoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	1	2,5	4	5,5

σ) 15,0 ccm Saft K[2])
1,5 „ m/2-Glucoselösung
0,15 „ m/10-phenylglyoxalsaures K.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	2	4,5	6,5	8

τ) 15,0 ccm Saft K[2])
1,5 „ m/2-Glucoselösung
0,15 „ m/10-phenylbrenztraubensaures K.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	2,5	5	7	9

---

[1]) In den Versuchen ν bis π derselbe Saft.
[2]) Zu den Versuchen ρ bis τ diente der gleiche Saft.

υ) 15,0 ccm Saft S
1,5 „ $^{m}/_{2}$-Glucoselösung

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	0,5	1,75	1,5	2

φ) 15,0 ccm Saft S
1,5 „ $^{m}/_{2}$-Glucoselösung
0,15 „ $^{m}/_{10}$-α-ketoglutarsaures K.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	1,5	3	5	6

χ) 15,0 ccm Saft S
1,5 „ $^{m}/_{2}$-Fructoselösung

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	0,3	1,0	1,5	3,0

ψ) 15,0 ccm Saft S
1,5 „ $^{m}/_{2}$-Fructoselösung
0,15 „ $^{m}/_{10}$-α-ketoglutarsaures K.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	0,5	1,8	2,5	4,0

ω) 15,0 ccm Saft S
1,5 „ $^{m}/_{2}$-Mannoselösung.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	0,2	1,2	1,7	2,5

aa) 15,0 ccm Saft S
1,5 „ $^{m}/_{2}$-Mannoselösung
0,15 „ m-α-ketoglutarsaures K.

Entw. ccm CO_2 nach	15′	30′	45′	60′
	0,5	2,0	3,5	5,0

Die gärungsbeschleunigende Wirkung der höheren Ketosäuren tritt bei Verwendung ihrer Salze genau so wie bei den Pyruvinaten zutage. In der Regel ist bei 28° die Stimulierung deutlicher als bei 37°, wo die Gärung an sich schon schnell verläuft.

Wir haben schließlich noch die freien Ketosäuren, sowie von der Brenztraubensäure und der Oxalessigsäure die Äthylester[1]) auf Aktivierungsvermögen geprüft. Den freien Säuren

[1]) Die Äthylester werden von Hefe schwach gespalten; vgl. C. Neuberg u. L. Karczag, diese Zeitschr. 37, 176, 1911.

ist es eigen, allerdings in schwächerem Maße; auch macht es sich erst bei höherer Konzentration geltend. Die Äthylester wirkten nach unseren bisherigen Erfahrungen nicht stimulierend, sofern sie völlig unverseift waren.

H. Minimumversuche.

Die ersten Versuche über die zuckerfreien Gärungen sind fast sämtlich mit reichlich Hefematerial angestellt worden. Bevor der Mechanismus der Carboxylase-Gärung aufgeklärt war, wurden naturgemäß große Mengen der frischen Hefen oder der Fermentpräparate angewendet, um eine möglichst ergiebige Enzymwirkung zu erzielen. Nachdem der Prozeß jetzt bis in Einzelheiten klargestellt worden ist und sich kein Punkt ergeben hat, der mit der Auffassung der Carboxylase als eines Teilenzyms der Zymasegruppe im Widerspruch stände, schien der experimentelle Beweis dafür wünschenswert, daß auch die Carboxylase in kleinsten Mengen Brenztraubensäure spaltet, ähnlich wie geringe Quantitäten Hefen größere Mengen Zucker umsetzen.

Entsprechende Versuche sind mit frischen ober- und untergärigen Hefen sowie mit Macerationssäften bei den üblichen Gärungstemperaturen, d. h. bei 28° und bei 37°, vorgenommen worden.

Das Ergebnis war, daß unzweifelhaft die Carboxylase in sehr geringen Mengen wirksam ist. Dieselbe Fermentmenge in Form frischer Hefen setzt zwar mehr Zucker um; bei Macerationssäften ist umgekehrt die Einwirkung auf Brenztraubensäure erheblich stärker. Auf alle Fälle ist der Schluß gerechtfertigt, daß auch sehr kleine Mengen Carboxylase die zuckerfreien Gärungen auslösen.

Für die hier behandelte Frage war es unnötig, die unterste Grenze der Fermentmenge zu ermitteln, die noch Brenztraubensäure zerlegt. Denn die mitgeteilten Daten zeigen, daß sich Carboxylase und „Zymase“ gleich „stark“ gegen ihre spezifischen Substrate verhalten.

Wir haben weiter festgestellt, daß Carboxylase in kleinster Menge auch auf die höheren Ketosäuren einwirkt, so auf die α-Ketobuttersäure, α-Ketocapronsäure und die Oxalessigsäure.

1. Versuche mit frischen Hefen.

Temp. 28°.

α) 16,0 ccm H_2O
0,15 g feuchte Hefe XII.

Entw. ccm CO_2 nach	10h	24h
	0	0

β) 15,0 ccm H_2O
1,0 „ m-Brenztraubensäure (= 0,088 g)
0,15 g Hefe XII.

Entw. ccm CO_2 nach	10h	24h
	0,5	2,5

γ) 15 ccm H_2O
1 „ m-Ketobuttersäure (= 0,102 g)
0,15 g Hefe XII.

Entw. ccm CO_2 nach	10h	24h	34h
	0,5	1	1

δ) 14,0 ccm H_2O
2,0 „ m/2-Ketocapronsäure (= 0,13 g)
0,15 g Hefe XII.

Entw. ccm CO_2 nach	10h	24h	34h
	0,5	1	1,75

ε) 10,0 ccm H_2O
4,0 „ m/4-Oxalessigsäure (= 0,132 g)
0,15 g Hefe XII.

Entw. ccm CO_2 nach	10h	24h	34h
	0,5	1,75	2,5

ζ) 16,0 ccm H_2O
0,1 g Traubenzucker
0,15 „ Hefe XII.

Entw. ccm CO_2 nach	10h	24h	34h
	2	3	3,5

η) 16,0 ccm H_2O
0,15 g Hefe K.

Entw. ccm CO_2 nach . . .	10h	24h	34h
	0	0	Spur

ϑ) 15,0 ccm H_2O
1,0 „ m-Brenztraubensäure (= 0,088 g)
0,15 g Hefe K.

Entw. ccm CO_2 nach	10h	24h	34h
	2,5	3	3

ι) 15,0 ccm H_2O
1,0 „ m-α-Ketobuttersäure (= 0,102 g)
0,15 g Hefe K.

Entw. ccm CO_2 nach	10h	24h	34h
	1	1	1

κ) 14,0 ccm H_2O
2,0 „ m/2-Ketocapronsäure (= 1,30 g)
0,15 g Hefe K.

Entw. ccm CO_2 nach	10h	24h	34h
	Spur	Spur	1,5

λ) 10,0 ccm H_2O
4,0 „ m/4-Oxalessigsäure
0,15 g Hefe K.

Entw. ccm CO_2 nach	10h	24h	34h
	1	1,5	2,5

μ) 16,0 ccm H_2O
0,1 g Traubenzucker
0,15 „ Hefe K.

Entw. ccm CO_2 nach	10h	24h	34h
	4	5,75	6,5

2. Versuche mit Macerationssaft.

Temp. 37°.

α) 14 ccm H_2O
2 „ Saft UM[1])

Nach 24h: 0 ccm CO_2.

β) 13 ccm H_2O
1 „ 2-m-Brenztraubensäure
2 „ Saft UM

Nach 24h: 3 ccm CO_2.

[1]) Wenn 400 g lufttrockene Hefe UM mit 1200 ccm Wasser angerührt wurden, so betrug das Volumen 1550 ccm. 1 ccm Saft ist demnach rund $= \frac{400}{1550} = 0{,}258$ g lufttrockene Hefe.

γ) 12 ccm H_2O
1 „ 2-m-Brenztraubensäure
1 „ 2-m-K_2HPO_4
2 „ Saft UM.

Nach 1^h: 2 ccm CO_2, nach 24^h: 10 ccm CO_2.

δ) 12 ccm H_2O
2 „ m-Glucoselösung
2 „ Saft UM.

Nach 24^h: 0,25 ccm CO_2.

ε) 12 ccm H_2O
2 „ m/2-Rohrzuckerlösung
2 „ Saft UM.

Nach 24^h: Spur CO_2.

J. Erfahrungen über die Selbstgärung von Macerationssäften nach dem Ausfall von 67 Proben.

Das Studium der Carboxylase ist wesentlich erleichtert worden durch den Umstand, daß sie leicht vom Leben der Zelle abgetrennt werden kann[1]). Nachdem wir die Carboxylase in dem sogenannten Macerationssaft nach von Lebedew aufgefunden hatten[2]), ist dieses bequem zugängliche Fermentmaterial vielfach zu einschlägigen Untersuchungen benutzt worden.

Als einen wesentlichen Vorzug des Macerationssaftes hat von Lebedew[3]) angegeben, daß er bei richtiger Herstellung keine Selbstgärung zeige. Dadurch unterscheidet sich der Lebedewsche Macerationssaft von dem Buchnerschen Hefepreßsaft. Letzterer wird in der Kälte gewonnen, ersterer in der Wärme. Es ist nun durchaus verständlich, daß bei einer Digestion im Brutschrank von 37° die durch osmotische Vorgänge aus dem Zellinneren auswandernden verschiedenen Kohlenhydrate[4]) vergoren werden, so daß ein Saft hervorgeht, der praktisch keine Selbstgärung zeigt.

---

[1]) C. Neuberg und L. Tir, diese Zeitschr. 32, 329, 1911; C. Neuberg und P. Rosenthal, diese Zeitschr. 51, 136, 1913.

[2]) C. Neuberg und Joh. Kerb, diese Zeitschr. 47, 418, 1912.

[3]) A. v. Lebedew, Ann. de l'Inst. Pasteur 1912, 8; Zeitschr. für physiol. Chem. 73, 447, 1911.

[4]) Vergl. hierzu E. Salkowski, Zeitschr. für physiol. Chem. 92, 75, 1914.

Es liegt auf der Hand, wie wichtig es für die Benutzung des Macerationssaftes ist, wenn man sich darauf verlassen kann, daß er keine störende Selbstgärung aufweist. Die Angaben Lebedews haben wir früher im ganzen bestätigen können; dagegen bestreitet M. Oppenheimer[1]) die Richtigkeit des Lebedewschen Befundes. Seitdem wir uns der Macerationssäfte bedienen, haben wir ausnahmslos Kontrollen über die Selbstgärung angestellt und die Verhältnisse zumeist auch quantitativ verfolgt. So verfügen wir über ein vergleichbares Material, das sich auf 67 Proben verschiedener Macerationssäfte bezieht. Dieselben sind zum kleineren Teile aus käuflicher Münchener Hefe (nach von Lebedew) gewonnen, größtenteils aus selbstgetrockneten Hefen bereitet. Diese entstammten ausnahmslos dem Institut für Gärungsgewerbe in Berlin. Sie wurden an der Luft oder meistens im Faust-Heimschen Apparat bei ca. 25^0 so lange getrocknet, bis sie sich im Mörser mühelos pulvern ließen. Wir fanden es zweckmäßig, die Zeit der Maceration (mit der dreifachen Menge Wasser) auf $2^1/_2$ Stunden auszudehnen. Wir verfahren dabei so, daß die Trockenhefe unter Rühren in Wasser von 40^0 eingetragen wird und daß die Mischung noch warm sogleich in den Brutschrank gelangt.

Von den klaren Säften dienten in der Regel 15 ccm zur Prüfung auf etwaige Selbstgärung. Sie wurden in kurzen Eudiometern mit Quecksilberverschluß unter Zugabe von Toluol mehr oder minder lange Zeit stehen gelassen. Dabei haben wir festgestellt, daß Toluol in der üblichen Konzentration oft nicht ausreicht, die Tätigkeit gasbildender Bakterien zu unterdrücken, indem die entwickelten Blasen nur z. T. von Lauge absorbierbar waren. Es zeigte sich weiter, daß eine sich ansammelnde Gasmenge, selbst wenn sie aus Kohlendioxyd bestand, nicht immer auf Selbstgärung zurückzuführen ist, sondern lediglich auf eine mechanische (oder chemische) Entbindung von Kohlendioxyd aus dem mit Kohlensäure bzw. Carbonaten gesättigten Saft. Diese Tatsache ward offenbar, wenn die Säfte vorher mit kohlensäurefreier Luft oder mit Wasserstoffgas gesättigt waren. In einigen Fällen trat eine, wenn auch geringe Selbstgärung unzweifelhaft auf. Sie ist jedoch niemals von der

[1]) M. Oppenheimer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 89, 75, 1914.

Größenordnung gewesen, die Oppenheimer behauptet, und es kann gar keine Rede davon sein, daß die von diesem Autor gemachten Angaben in der Mehrzahl der Fälle zutreffen. Immerhin dürfte die eigene Bereitung der Trockenhefe in der von uns geübten Weise der Benutzung von käuflicher Trockenhefe vorzuziehen sein, zumal allem Anschein nach durch die Trocknung bei 25° und die etwas ausgedehntere Digestion ($2^1/_2$ Stunden) Säfte erhalten werden, die praktisch allermeist frei von Selbstgärung sind.

Bei dieser Gelegenheit möchten wir darauf hinweisen, daß die selbstgewonnenen Trockenhefen sich schon äußerlich vorteilhaft von der Handelsware unterscheiden. Sie zeigen einen angenehm aromatischen Duft, während letztere dumpf, käseartig riecht. Auf den Gehalt der käuflichen Trockenhefe an Bakterien und an Aminen, die wohl durch diese hervorgebracht werden, haben wir wiederholt aufmerksam gemacht[1]). Man hat es auch in der Hand, sehr „glykogenreiche“ Hefen vorher nach den Angaben von W. Henneberg sowie Buchner und Mitscherlich[2]) zu entzuckern und so für die Gewinnung eines Saftes ohne Selbstgärung vorzubereiten. Wir haben diese Behandlung mit Erfolg bei einer Portion der Hefe K vorgenommen. Übrigens nähert sich unsre Vorbehandlung ganz allgemein obiger Vorschrift von Buchner und Mitscherlich. Enthält die Ausgangshefe nicht zu viel tote Zellen, so ist der aus der Trockenhefe gewonnene Preßsaft befriedigend.

Die mitgeteilten Erfahrungen über die 67 Proben von Macerationssäften stellen zugleich einen Beitrag zu der Frage dar, welche Hefen sich zur Gewinnung von gärkräftigen Macerationssäften eignen. Denn nach den Angaben der Literatur ist deren Darstellungsmöglichkeit genau wie die von Hefepreßsaft beschränkt. Mit Säften aus obergärigen Hefen hatten wir stets negative Ergebnisse zu verzeichnen; wohl war in ihnen Carboxylase, aber keine Zymase nachweisbar. Dagegen haben wir

---

[1]) C. Neuberg und Joh. Kerb, diese Zeitschr. **53**, 498, 1912; **56**, 501, 1913; **62**, 492, 1914.

[2]) W. Henneberg, Wochenschr. f. Brauerei **19**, 651, 1902; **21**, 376 u. 474, 1904. — E. Buchner u. S. Mitscherlich, Zeitschr. f. physiolog. Chemie **42**, 554, 1904.

Tabellarische Übersicht über das Verhalten von 67 Proben verschiedener Macerationssäfte hinsichtlich der sogenannten Selbstgärung.

Nr.	Saft aus Hefenrasse u. Jahr	Temperatur	Antisepticum	Bei der Selbstgärung von 15 ccm Saft entwickelte ccm Gas nach				Bemerkungen
		°		6^h	10^h	24^h	48^h	
1	S (1912)	28	0,15 ccm Toluol	0	0,5	0,5	1,5	
2	S (1912)	37	"	0,25	0,75	1,0	2,0	Nur zur Hälfte durch KOH absorbierbares Gas (Bakterien).
3	S (1912)	16—18	"	0	0,25	0,5	0,5	
4	S (1912)	28	0,15 ccm Chloroform	0	0	0	1,0	
5	S (1912)	37	"	0	0,25	0,5	1,5	Völlig von KOH absorbierbares Gas.
6	S (1912)	15—18	"	0	0	0	Spur	
7	S (1912)	28	0,1 ccm NaF	0	0	0	0	Anfangs geringe, später starke Koagulation.
8	S (1913)	28	1 ccm Allylsenföl	0	0	0	0	
9	S (1913)	37	"	0	0	0	Spur	Spärliche Ausflockung.
10	S (1913)	17—23	"	0	0	0	0	
11	S (1913)	28	1,5 ccm Toluol	0	0	0,5	0,5	
12	S (1913)	37	"	0	0	1,0	1,5	Völlig durch KOH absorbierbares Gas.
13	S (1913)	20—26	"	0	0	0,5	0,5	
14	S (1918)	28	1,5 ccm Chloroform	0	0	0	0	
15	S (1913)	37	"	0	0	0	0	Allmählich stärker werdende Ausflockung.
16	S (1913)	20—26	"	0	0	0	0	
17	S (1914)	28	0,25 ccm Toluol	0	0,5	0,75	1,0	Derselbe Saft. Bei geringem Toluolzusatz Bild. von teilweise absorbierbar. Gas (Bakterienwachstum). Bei höherem Toluolgehalt keine Gasentwicklung!
18	S (1914)	37	"	Spur	0,5	1,0	2,0	
19	S (1914)	28	1,5 ccm Toluol	0	0	0	Spur	
20	S (1914)	37	"	0	0	0	Spur	

(Fortsetzung.)

Nr.	Saft aus Hefenrasse u. Jahr	Temperatur °	Antisepticum	Bei der Selbstgärung von 15 ccm Saft entwickelte ccm Gas nach 6h	10h	24h	48h	Bemerkungen.
21	S (1914)	37	1 ccm Toluol	0	0,5	1,0	2,0	Derselbe Saft. Probe 21 ist nativer Saft, Probe 22 vorher 2 Std. bei Zimmertemp. mit Wasserstoffgas gesättigt. In Nr. 21 alles Gas durch KOH absorbierbar, in Nr. 22 völlig unabsorbierbar. Demnach ist in 21 nur gelöste CO_2 anzunehmen.
22	S (1914)	37	"	0,25	0,25	0,25	0,25	
23	U (1913)	28	1,5 cm Toluol	0	0	0	0	Von einer Saftprobe.
24	U (1913)	37	"	0	0	0	Spur	
25	U (1913)	13—15	"	0	0	0	0	
26	U (1913)	28	1 ccm Chloroform	0	0	0	0	Von einer Saftprobe.
27	U (1913)	37	"	0	0	0	0	
28	U (1913)	16—20	"	0	0	0	0	
29	U (1914)	28	1 ccm Toluol	0	Spur	0,5	0,5	Völlig von KOH absorbierbar.
30	U (1914)	37	"	0	Spur	1,0	1,0	
31	U (1914)	28	0,1 ccm Toluol	0,5	0,5	1,5	3,0	Nur zu etwa 1/3 von KOH absorbierbares Gas (starke Bakterienentwicklung).
32	U (1914)	37	"	0,5	1,0	1,5	4,0	
33	UM (1912)	28	0,15 ccm Toluol	0	0	0	Spur	Von einer Saftprobe.
34	UM (1912)	37	"	0	0	0	Spur	
35	UM (1912)	28	0,15 ccm Chloroform	0	0	0	0	Von einer Saftprobe.
36	UM (1912)	37	"	0	0	0	Spur	
37	UM (1912)	28	0,05 ccm NaF	0	0	0	Spur	Ausflockung.
38	UM (1913)	28	0,75 ccm Allylsenföl	0	0	0	0	Von einer Saftprobe.
39	UM (1913)	37	"	0	0	0,5	0,5	
40	UM (1913)	28	0,1 ccm Toluol	0,5	1,0	1,0	3,0	Von einer Saftprobe; in Nr. 40 Bakterienentwickl., Gas fast völlig unabsorbierbar.
41	UM (1913)	28	1,0 ccm Toluol	0	0	0	0,5	

(Fortsetzung.)

Nr.	Saft aus Hefenrasse u. Jahr	Temperatur °	Antisepticum	Bei der Selbstgärung von 15 ccm Saft entwickelte ccm Gas nach 6h	10h	24h	48h	Bemerkungen.
42	UM (1914)	37	1 ccm Toluol	0	1,0	2,0	2,5	Gänzlich von KOH absorbierbar.
43	UM (1914)	37	„	0	0	0	0	Der gleiche Saft wie 42; 2 Std. bei Zimmertemperatur mit Wasserstoff gesättigt.
44	UM (1914)	37	„	0	0	0	Spur	Der gleiche Saft wie in Nr. 41 u. 42; 2 Std. bei Zimmertemperatur mit CO_2-freier u. steriler Luft gesättigt.
45	UM (1014)	37	0,1 ccm Toluol	0	0,5	0,75	1,5	Der gleiche Saft wie bei Nr. 42 bis 44; gelöste CO_2 durch 2 stündige Behandlung mit steriler u. CO_2-freier Luft ausgetrieben. Die Menge Antisepticum reicht nicht hin, ein Bakterienwachstum zu verhüten. Gas nicht absorbierbar.
46	UM (1914)	28	0,5 ccm Chloroform	0	0	0	Spur	
47	UM (1914)	37	„	0	0	Spur	0,5	Von einer Saftprobe. (Nr. 46–48)
48	UM (1914)	9—12	„	0	0	0	0	
49	UM (1914)	28	1,5 ccm Toluol	0	0	0	0	Von einer Saftprobe. (Nr. 49–50)
50	UM (1914)	37	„	0	0	0	Spur	
51	K (1912)	28	0,2 ccm Toluol	0	0	Spur	0,5	
52	K (1912)	37	„	Spur	Spur	0,5	0,5	Von einer Saftprobe. (Nr. 51–53)
53	K (1912)	20—22	„	0	0	Spur	0,5	
54	K (1913)	37	0,15 ccm Toluol	0,5	0,5	1,0	1,75	Von einer Saftprobe. Nr. 56 zuvor 2 Std. mit Wasserstoff, Nr. 57 u. 58 zuvor 2 Std. mit CO_2-freier u. steriler Luft gesättigt. Trotz großer Menge Antisepticum ist alles Gas von KOH absorbierbar. Wirkliche Selbstgärung. (Nr. 54–58)
55	K (1913)	37	1,5 ccm Toluol	0,5	0,5	1,0	1,75	
56	K (1913)	37	„	0,5	0,5	0,75	1,75	
57	K (1913)	37	„	0,5	0,5	1,0	1,5	
58	K (1913)	28	„	Spur	Spur	0,75	1,5	

(Fortsetzung.)

Nr.	Saft aus Hefenrasse u. Jahr	Temperatur °	Antisepticum	Bei der Selbstgärung von 15 ccm Saft entwickelte ccm Gas nach 6h	10h	24h	48h	Bemerkungen.
59	K (1913)	28	1,5 ccm Toluol	0	0	0	0	Dieselbe Hefe, welche zur Bereitung von Trockenhefe für den Saft der Versuche 54—58 gedient hatte, wurde zuvor durch Vorbehandlung nach Buchner (l. c.) „glykogenfrei“ gemacht. Die zentrifugierte Hefe wurde alsdann in üblicher Weise getrocknet u. auf Saft verarbeitet. Dieser zeigte jetzt keine Spur Selbstgärung mehr bei ausgezeichnetem Gärvermögen.
60	K (1913)	37	„	0	0	0	0	
61	K (1913)	14—17	„	0	0	0	0	
62	K (1913)	28	1 ccm Toluol	0	0	0	0	Der Versuch, der den Saft der Experimente 59—61 geliefert hatte, wurde ein halbes Jahr später mit dem gleichen Erfolge wiederholt.
63	K (1913)	37	„	0	0	0	0	
64	K (1913)	16—18	„	0	0	0	0	
65	K (1914)	28	0,5 ccm Chloroform	0	0	Spur	Spur	Trübung.
66	K (1914)	28	1,5 ccm Chloroform	0	0	0	Spur	Schwache Flockung.
67	K (1914)	28	0,75 ccm Allylsenföl	0	0	0	Spur	Trübung.

aus sämtlichen darauf geprüften Unterhefen (K, U, MU) ausgezeichnet wirkende Macerationssäfte erhalten.

Die Gärkraft ist — genau wie bei frischen Hefen — gewissen Schwankungen unterworfen, die sich nicht mit Bestimmtheit erklären lassen. Bei scheinbar völlig gleicher Arbeitsweise zeigt der Hefensaft aus der gleichen Rasse nicht unwesentliche Unterschiede, namentlich im Angärungsvermögen und in der Empfindlichkeit gegen Zusätze vom Charakter der freien Brenztraubensäure. Mit Differenzen im Eiweißgehalt lassen sich diese Schwankungen nicht erklären, wie wir ausdrücklich festgestellt haben. Eine wichtige Rolle spielt offenbar ein wirklich wechselnder Gehalt an Fermenten wie an natürlichen Aktivatoren und Moderatoren, die bald ein optimales, bald ein weniger günstiges „Milieu“ schaffen. Die erwähnten Schwankungen sind allen Sachkennern hinlänglich bekannt.

K. Über das Verhalten von Invertaselösung bei jahrelanger Aufbewahrung.

In festem Zustande haben bekanntlich viele Fermente eine große Beständigkeit, während ihre Haltbarkeit in Lösung begrenzt ist. Früher[1]) konnte bereits über das Verhalten einer mehr als ein Jahr hindurch im Laboratorium aufbewahrten Invertaselösung (autolysierten Hefe) berichtet werden. Die Untersuchung an dem gleichen Material ist fortgesetzt und hat seine unveränderte Wirksamkeit ergeben.

Von der am 3. Juni 1912 angestellten Hefenaufschwemmung wurden am 27. Juli 1914 nach gründlichem Durchschütteln 20,0 ccm entnommen Dieselben wurden mit 50 ccm Wasser und 20 g Rohrzucker versetzt. Nach 21stündiger Aufbewahrung im Brutschrank von 37° wurde die Mischung abgekühlt und durch Zugabe von 10,0 ccm colloidalem Eisenhydroxyd und Wasser auf ein Volumen von 100,0 ccm gebracht. Das farblose Filtrat war lävogyr, und zwar im 1 dcm-Rohr entsprechend — 4,05 % Glucose. Am 30. Juli und 17. September 1913 war ganz entsprechend der Wert = — 4,0 % gefunden.

Somit hat die Invertaselösung eine beinahe 800tägige Aufbewahrung bei Zimmertemperatur ohne Schädigung vertragen.

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 56, 495, 1913.

Die Gärung der Dioxymaleinsäure.

Von

Carl Neuberg und Erwin Schwenk.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Die Untersuchungen über die zuckerfreien Gärungen haben gelehrt, daß außer der Brenztraubensäure zahlreiche andere α-Ketosäuren von Hefen bzw. durch das in ihnen enthaltene Ferment Carboxylase unter Abspaltung von Kohlensäure zerlegt werden. Wie die Beispiele der isomeren Formen der Oxalessigsäure, das der α-Ketoglutarsäure und der Dioxobernsteinsäure zeigen, sind auch die α-Ketosäuren mit zwei Carboxylen im Molekül der zuckerfreien Gärung fähig. Ein in biologischer Hinsicht sehr interessanter Vertreter dieser Reihe liegt in der Dioxymaleinsäure (I) vor, die auch

I	II
COOH	COOH
|	|
COH	CO
‖	|
COH	CH.OH
|	|
COOH	COOH.

als Glykolaldehyddicarbonsäure (II) (Oxyoxalessigsäure oder Glykolyloxalsäure) aufgefaßt werden kann. Zwar hat schon der Entdecker dieser Substanz, H. J. Fenton[1]), festgestellt, daß sie beim Erwärmen mit Wasser auf 50 bis 60° eine Spaltung in Glykolaldehyd und Kohlendioxyd erleidet. Aber bei niederen Temperaturen ist die Dioxymaleinsäure beständig genug, um das Studium der Hefeneinwirkung zu gestatten.

---

[1]) H. J. Fenton, Journ. of Chem. Soc. 65, 899, 1894.

Unter dem Einflusse der verschiedenen Hefesorten sowie von Trockenhefe und von Hefenmacerationssaft erfährt die Dioxymaleinsäure bei 16°—18° eine Spaltung unter Entwicklung von Kohlendioxyd und Bildung von Glykolaldehyd. Die Zerlegung der Säure durch lebende Hefe ist bei Zimmertemperatur stets sehr viel erheblicher als der freiwillige Zerfall in der gleichen Zeit.

Diese Entstehung von Glykolaldehyd durch einen Gärakt entspricht vollständig der Bildung der gleichen Substanz aus der Oxybrenztraubensäure; andererseits ist die Bildung von Glykolaldehyd, das ist Oxyacetaldehyd, aus der Oxalglykolsäure durchaus analog der Entstehung von Acetaldehyd aus der Oxalessigsäure. Der Zerfall, den die genannten α-Ketodicarbonsäuren in der Wärme erleiden und der in geringem Umfange auch bei niederer Temperatur eintritt, wird durch das Eingreifen der Carboxylase sehr wesentlich verstärkt und beschleunigt[1]).

Während die Bestimmung der losgelösten Kohlensäure leicht möglich ist, verhält es sich anders mit dem Nachweise des zweiten Spaltungsprodukts, des Glykolaldehyds. Eine Isolierung in Substanz ist in den ausgegorenen Ansätzen natürlich unmöglich. Dagegen fanden wir den Weg der Abscheidung als Osazon gangbar. Unveränderte Dioxymaleinsäure reagiert mit essigsaurem Phenylhydrazin unter Loslösung einer Carboxylgruppe und unter Bildung des schon von E. Fischer, Nastvogel und Will auf anderen Wegen erhaltenen Oxybrenztraubensäureosazons,

$$\begin{array}{l} COOH—\underset{\underset{\displaystyle N.NHC_6H_5}{\|}}{C}—CH:N.NHC_6H_5 \end{array}$$

Diese Einwirkung von Phenylhydrazinacetat hat bereits Fenton[2]) festgestellt. Wir können seine Angaben durchaus bestätigen und hinzufügen, daß bei der Einwirkung auf reine unzerlegte Dioxymaleinsäure ausschließlich Oxybrenz-

---

[1]) Derartige Förderungen der Kohlensäureabspaltung aus relativ beständigen Carbonsäuren hat man auch durch die Einwirkung tierischer Organe erzielt; so bei der Acetessigsäure (L. Pollak, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 10, 232, 1907) und bei den Oxalessigsäuren (P. Mayer, diese Zeitschr. 62, 462, 1914).

[2]) H. J. Fenton, Journ. of Chem. Soc. 87, 804, 1905.

traubensäureosazon entsteht und keine Spur Glykolaldehydosazon, dessen Auftreten die Loslösung eines zweiten Carboxyls zur Voraussetzung hätte. Aus den vergorenen Dioxymaleinsäurelösungen erhält man dagegen Glykolaldehydosazon neben Oxybrenztraubensäureosazon. Ob letzteres nur aus unzerlegter Dioxymaleinsäure oder aus durch Hefeeinwirkung unter einfacher Decarboxylierung entstandener Carbonylsäure der 3-Kohlenstoffreihe hervorgeht, kann nicht entschieden werden. Auch die zur Kontrolle ohne Hefebeigabe aufbewahrten Ansätze von Dioxymaleinsäure in Wasser ergaben etwas Glykolaldehydosazon infolge des bekannten freiwilligen Zerfalls der Dioxymaleinsäure. Aber die Unterschiede sind — namentlich bei Verwendung der mit Dikaliumphosphat gepufferten Dioxymaleinsäure — groß genug, um die Bildung von Glykolaldehyd durch den Gärakt mit Sicherheit feststellen zu können. Glykolaldehydosazon und Oxybrenztraubensäureosazon lassen sich auf Grund der Fähigkeit des letzteren, Salze zu bilden, leicht trennen. Durch verdünnte Sodalösung wird die Oxybrenztraubensäureverbindung herausgelöst.

Schließlich können wir anhangsweise noch einige Erfahrungen über die Darstellung der Dioxymaleinsäure selbst mitteilen; ihre Bereitung verursacht nach den Angaben der Literatur erfahrungsgemäß Schwierigkeiten, die wir beseitigt zu haben glauben.

Experimenteller Teil.

I.

Vergärung von Dioxymaleinsäure bei Zimmertemperatur (14 bis 17°).

a) Es wurden 0,5 g der reinen Dioxymaleinsäure, $C_4H_4O_6 + 2H_2O$, mit 50 ccm Leitungswasser durch gutes Verrühren bei Zimmertemperatur möglichst in Lösung gebracht und in 10 ccm der gleichmäßigen Suspension 1 g Oberhefe Rasse XII gut verteilt. Die ganze Flüssigkeit wurde in ein Eudiometer gegeben und dieses in der üblichen Weise in eine Schale mit Quecksilber eingetaucht. 10 ccm der Säuresuspension wurden in einem andern Eudiometer in dieselbe Schale eingebracht und beide Röhren im Zimmer aufgestellt, dessen Temperatur von 14 bis 17° schwankte. Der Barometerdruck war 755,5 mm.

In Stunden	ccm CO_2 entwickelt		
	mit Säure + Hefe	Säure allein	Hefe allein
$2^1/_4$	Spuren	0	0
$3^1/_2$	1,0	0	0
$6^1/_2$	2,0	0	0
$10^1/_2$	5,0	0,4	0
21	7,5	0,8	0
26	10,0	1,2	0
47	20,0	1,4	Spur
69	21,0	3,0	0,25

Unter Zugrundelegung der maximalen Zerfallsmöglichkeit der Dioxymaleinsäure findet man, daß im vorstehenden Versuch von Hefe 16,1% CO_2 freigemacht wurden, während aus der Säure allein unter denselben Bedingungen nur 2,3% CO_2 entstanden.

b) Ein zweiter Versuch wurde mit einer untergärigen Hefe angestellt.

0,2 g Dioxymaleinsäure wurden in 40 ccm Leitungswasser verteilt. 10 ccm dieser Mischung wurden mit 1 g Unterhefe UM gut verrührt und der Ansatz in ein Eudiometer gefüllt. Diesmal wurde als Kontrollversuch ein Eudiometer angesetzt, in dem sich eine Aufschwemmung von 1 g derselben Hefe UM in 10 ccm Leitungswasser befand. Dieser Versuch wurde gleichfalls bei Zimmertemperatur (16 bis 18°) durchgeführt.

In Stunden	ccm CO_2 entwickelt	
	mit Säure + Hefe	Hefe allein
$^1/_2$	Spuren	0
14	4,0	0
17	4,5	0,2
19	5,0	0,2

Wie man sieht, bleibt auch die Selbstgärung der Hefe UM weit hinter dem durch die Carboxylase verursachten Zerfall der Dioxymaleinsäure zurück.

II.

Nachdem so die typische Zerlegbarkeit der Dioxymaleinsäure durch Hefen bei Zimmertemperatur festgestellt worden war, haben wir einige Versuche über die Wirksamkeit verschiedener Hefen und Hefenpräparate bei 28° angestellt. Dabei kam freie, wie verschiedenartig gepufferte Dioxymaleinsäure zur Verwendung.

a) 0,15 g der Säure wurden mit 15 ccm Wasser und 1,5 g Oberhefe XII gut verrührt. Diese Mischung kam dann in ein Gärröhrchen. Als Parallelversuch wurden 15 ccm Säuresuspension ohne Hefe ebenfalls im Gärröhrchen angesetzt. Beide Gärröhrchen wurden, wie bei den folgenden Versuchen, in einen auf 28° gewärmten Brutschrank gestellt.

In Stunden	ccm CO_2 entwickelt	
	mit Säure + Hefe	Säure allein
1	Spuren	0
2	2,0	0,2
$2^3/_4$	5,0	0,4
$4^1/_4$	9,0	0,5
5	11,0	0,7
$5^3/_4$	12,0	0,7

Das Gas, das sich in den Röhrchen angesammelt hatte, erwies sich als durch Natronlauge vollkommen absorbierbar, war also Kohlensäure. Die vergorene Lösung reduzierte stark.

b) 0,15 g Säure wurde mit 15 ccm Leitungswasser und 1,5 g Unterhefe UM angerührt. Als Parallelversuch wurden 1,5 g derselben Hefe in 15 ccm Leitungswasser aufgeschwemmt und beide Mischungen in Gärröhrchen im Brutschrank von 28° aufbewahrt.

In	ccm CO_2 entwickelt	
	mit Säure + Hefe	Hefe allein
10 Min.	Spuren	0
45 „	0,5	0
$13^3/_4$ Std.	4,0	0
$16^3/_4$ „	4,5	0
$18^3/_4$ „	5,0	0

c) 0,15 g der Säure wurden mit 15 ccm Macerationssaft (aus Trockenhefe S) gut verrührt und sofort in ein Gärröhrchen eingefüllt. Ein zweites Gärröhrchen wurde zur Prüfung auf Selbstgärung des Hefesaftes mit diesem allein gefüllt.

In Stunden	ccm CO_2 entwickelt	
	mit Säure + Hefesaft[1])	Hefesaft allein
$^3/_4$	2,0	0
1	6,0	0
$2^1/_2$	7,0	0
$13^1/_2$	12,0	0,2

[1]) In diesem Röhrchen trat alsbald eine beträchtliche Fällung ein.

d) Weitere Prüfungen erfolgten mit einem anderen Macerationssaft, der aus frischerer Trockenhefe UM gewonnen war. Der Saft kam verdünnt wie ohne Wasserzusatz zur Verwendung. Die Mengenverhältnisse waren sonst die gleichen.

In Stunden	ccm CO_2 entwickelt aus			
	Säure + Hefesaft	Hefesaft allein	Säure + halbverd. Hefesaft	halbverd. Hefesaft allein
1	12	0	12	0

Die Säure wird demnach von dem ursprünglichen wie vom verdünnten Saft gut vergoren.

e) Mit dem gleichen Hefesaft wie bei c) wurden zwei Versuche angestellt, in denen die Dioxymaleinsäure zuvor gepuffert war.

0,15 g der kristallwasserhaltigen Säure und 0,28 g K_2HPO_4 wurden mit 15 ccm Hefesaft gut verrieben; ebenso wurde mit 0,15 g Säure und 0,315 g $Na_2B_4O_7 + 10H_2O$ verfahren. Beide Mischungen wurden in Gärröhrchen gefüllt.

In Stunden	ccm CO_2 entwickelt	
	mit Säure + K_2HPO_4	Säure + $Na_2B_4O_7$ + 10 aq
1/2	Spuren	0
2	2,0	Spuren
3	3,0	0,8
6	5,5	1,0
24	11,0	3,0
33	12,0	3,5
58	12,0	5,0

f) 0,15 g Dioxymaleinsäure und 0,29 g Dikaliumphosphat wurden in 15 ccm Leitungswasser gelöst und in dieser Lösung 1,5 g durch wiederholtes Waschen mit Wasser und Aceton von Ko-Ferment befreiter Trockenhefe S[1]) gut verteilt. Als Kontrollen wurden in der gleichen Menge Wasser 0,15 g Säure + 0,29 g Phosphat, und schließlich 1,5 g Hefe mit 0,29 g Phosphat (Prüfung auf Selbstgärung) in Gärröhrchen angesetzt.

In Stunden	ccm CO_2 entwickelt		
	mit Säure + Phosphat + Hefe	Säure + Phosphat	Hefe + Phosphat
1 1/4	Spuren	0	0
15 1/4	4,5	0,1	0
21 1/4	5,0	0,2	0

[1]) A. Harden, Biochem. Journ. 7, 215, 1913.

Demnach vergärt auch koenzymfreie Hefe die Dioxymaleinsäure.

III.

Isolierung der Gärungsprodukte.

a) Versuch mit ungepufferter Dioxymaleinsäure.

3 g der Säure wurden in 500 ccm Leitungswasser mit 30 g Hefe XII gleichmäßig verteilt und die Mischung in einem mit Wattebausch verschlossenen Erlenmeyerkolben bei Zimmertemperatur (17°) sich selbst überlassen. Daneben wurde in sonst gleicher Weise, aber ohne Hefe, eine Lösung von 1 g Säure in 170 ccm Leitungswasser angesetzt. Nach 3 tägigem Stehen wurde von der Hefe im ersten Kolben abfiltriert und die erhaltene Lösung durch einen geringen Zusatz von kolloidalem Eisenhydroxyd geklärt. Das farblose Filtrat sowie der Inhalt des zweiten Kolbens wurden mit etwas mehr als der berechneten Menge Phenylhydrazin, gelöst in Essigsäure, versetzt und $2^1/_2$ Stunden im Zimmer und schließlich 48 Stunden im Brutschrank von 37° stehen gelassen. Die entstandenen Niederschläge wurden abgesaugt, mit Wasser gewaschen und hierauf mit $10^0/_0$ iger Natriumcarbonatlösung ausgekocht. Aus der heiß filtrierten Lösung schieden sich bald flimmernde Kryställchen ab. Ohne auf diese zu achten, wurde das ganze Filtrat mit Salzsäure bis zur schwach sauren Reaktion versetzt und nach einigem Stehen filtriert. Der so erhaltene Niederschlag besteht aus dem Osazon der Oxybrenztraubensäure. Dieser sowie der Rückstand von der Auskochung mit Soda, der das Glykolaldehydosazon enthält, wurden aus Äthylalkohol unter Zusatz von Wasser mehrfach umkrystallisiert. Es war jedoch nicht möglich, die Osazone der Oxybrenztraubensäure in zur weiteren Untersuchung genügender Menge zu erhalten.

Die Ausbeute an Glykolaldehydosazon betrug aus dem
Hefeversuch[1] . . 0,950 g (Schp. 167°),
Säure allein . . . 0,117 g (Schp. 163 bis 164°) oder 0,35 g, umgerechnet auf die gleiche Menge Dioxymaleinsäure. Trotz des etwas zu niedrigen Schmelzpunktes erwiesen sich beide Verbindungen bei der Analyse als reines Glykolaldehydosazon.

[1]) Es ist wahrscheinlich, daß in diesen Versuchen ein Teil des entstandenen Glykolaldehyds weiter in Glykol übergeführt wird (s. S. 114); darauf dürfte auch die geringe Ausbeute zurückzuführen sein.

Osazon aus dem Hefeversuch:
0,1017 g gaben 21,0 ccm N bei 750,5 mm und 17,0°.
Gefunden = 23,54 % N.

Osazon aus dem Versuch mit Säure allein:
0,0940 g gaben 19,4 ccm bei 750,5 mm und 17,5°.
Gefunden = 23,47 % N.
Berechnet für $C_{14}H_{14}N_4$ = 23,53 % N.

b) Versuch mit gepufferter Säure.

3 g der Dioxymaleinsäure wurden mit 5,7 g Dikaliumphosphat in 500 ccm Leitungswasser gelöst und 30 g Hefe Rasse XII in der Lösung gut verteilt. Weitere 3 g Säure mit 5,7 g Dikaliumphosphat in 500 ccm Leitungswasser wurden ohne Hefe angesetzt. Zu beiden Ansätzen wurde noch soviel festes Kaliumcarbonat zugegeben, daß die Reaktion ganz schwach alkalisch war. Nach 3 tägigem Stehen bei Zimmertemperatur (16 bis 18°) wurden die beiden Ansätze wie in dem zuvor beschriebenen Versuch aufgearbeitet. Diesmal konnte aus beiden Anteilen nicht nur reines Osazon des Glykolaldehyds, sondern auch das der Oxybrenztraubensäure in einer zur Analyse hinreichenden Menge isoliert werden.

Die Ausbeuten betrugen:

α) bei dem Hefeversuch:
1. Glykolaldehydosazon . . . F. 173 bis 175°, 2,1 g,
2. Oxybrenztraubensäureosazon F.[1]) 202 „ 203°, 0,6 g.

β) Versuch mit Säure allein:
3. Glykolaldehydosazon . . . F. 169 bis 170°, 0,5 g,
4. Oxybrenztraubensäureosazon F. 206°, 1,0 g.

Bei der Analyse erwiesen sich alle Osazone als rein.

Hefeversuch:

1. Glykolaldehydosazon:
0,1194 g gaben 24,8 ccm N bei 747 mm und 20°.
Gefunden = 23,36 % N;
berechnet für $C_{14}H_{14}N_4$ = 23,53 %.

---

[1]) E. Fischer, Nastvogel, sowie Will geben den Schmelzpunkt 201 bis 207° an, Fenton und Ryffel (Chem. Centralbl. 1902, I, 857) dagegen 222 bis 224°.

2. Oxybrenztraubensäureosazon:

0,0451 g gaben 7,8 ccm N bei 761 ccm und 20°.

Gefunden = 19,71 % N;

berechnet für $C_{15}H_{14}N_4O_2$ = 19,86 % N.

Versuch mit Säure für sich:

3. Glykolaldehydosazon:

0,0420 g gaben 8,8 ccm N bei 750 mm und 17,5°.

Gefunden = 23,82 % N;

berechnet für $C_{14}H_{14}N_4$ = 23,53 % N.

4. Oxybrenztraubensäureosazon:

0,0891 g gaben 15,5 mm N bei 760 mm und 20°.

Gefunden = 19,80 % N.

brechnet für $C_{15}H_{14}N_4O_2$ = 19,86 % N.

Anhang.

Über die Darstellung von Dioxymaleinsäure, $C_4H_4O_6 + 2H_2O$.

Für die Darstellung der genannten Säure hat zuerst H. J. Fenton[1]) und später J. U. Nef[2]) eine Vorschrift mitgeteilt. Die Angaben Fentons sind sehr allgemein gehalten, insbesondere führt der Autor weder für die zu verarbeitenden Mengen noch für die erzielten Ausbeuten Zahlen an. Solche finden sich zwar bei Nef, aber es ist weder uns noch andern im hiesigen Laboratorium arbeitenden Herren gelungen, die Ausbeuten Nefs bei Befolgung seiner Vorschrift auch nur entfernt zu erzielen. Man kann diese aber durch eine Kombination der Verfahren beider Autoren erreichen. Von Nef übernahmen wir die Verwendung von Eisensulfat und Seignettesalz statt des Ferrotartrats und von Fenton die Benutzung stärker konzentrierten Wasserstoffsuperoxyds als des gewöhnlichen Materials des Handels (3 bis 3,5 gewichtsprozentig). Allerdings ist es zweckmäßig, die Konzentration des Wasserstoffsuperoxyds noch wesentlich höher als nach Fentons Angabe zu wählen. Sehr bewährt hat sich uns das 15 gewichtsprozentige = 50 volumprozentige Wasserstoffsuperoxyd, das von Merck sehr wohlfeil (viel billiger als Perhydrol) zu erhalten ist[3]).

---

1) H. J. Fenton, Journ. of Chem. Soc. 65, 899, 1894.

2) J. U. Nef, Liebigs Annalen 357, 290, 1907.

3) Vgl. auch J. A. Mandel u. C. Neuberg, diese Zeitschr. 71, 196, 1915.

Wir verfahren folgendermaßen:

Zu einer Lösung von 2 g Ferrosulfat und 2,4 g Seignettesalz in 40 ccm Wasser, die sich in einer weithalsigen Pulverflasche befindet, wird die Lösung von 100 g Weinsäure in 40 ccm H_2O gegossen und das Gefäß mit 20 ccm Wasser nachgespült. Durch Kältemischung kühlt man auf mindestens — 5° ab und läßt dann unter intensiver Rührung tropfenweise 160 ccm 15 gewichtsprozentiges Wasserstoffsuperoxyd zutropfen. Man achtet dabei darauf, daß die Temperatur stets unter — 2° bleibt und regelt demgemäß den Zufluß des Wasserstoffsuperoxyds. Ist die ganze Menge zugegeben, so stellt man die Flasche mindestens über Nacht in den Frigo, der auf — 6 bis — 10° abgekühlt ist. Am besten wird nach 36 bis 40 Stunden die Weiterverarbeitung vorgenommen. Nach dieser Zeit hat sich in der Flasche schon etwas Dioxymaleinsäure in flimmernden Krystallen abgesetzt, die aber durch basisches Eisensalz etwas gelb gefärbt sind. Man bettet die Flasche nun abermals in Kältemischung und läßt unter guter Rührung 40 ccm einer Mischung von 1 Teil Schwefelsäure von 33°/₀ Anhydridgehalt mit 3 Teilen gewöhnlicher konzentrierter Schwefelsäure zutropfen, wobei die Temperatur stets unter dem Gefrierpunkt bleiben muß. Nach 2 oder 3 Tagen hat sich ein großer Teil der Säure abgeschieden, den man absaugt. Der Niederschlag wird bis zum Verschwinden der Schwefelsäurereaktion mit möglichst wenig Eiswasser auf der Nutsche gewaschen. Aus dem Filtrat fällt manchmal fast ebensoviel Säure aus, wenn man es mit weiteren 40 ccm des obigen Schwefelsäuregemenges bei Temperaturen unter 0° versetzt. Bisweilen verlohnt sich noch eine dritte Fällung.

Wir führen die Ergebnisse von 3 größeren Ansätzen an und betonen dabei nochmals, daß in allen Phasen der Reaktion die Temperatur unter 0° gehalten werden muß.

Ausbeuten:

I.	Versuch	mit	100 g	Weinsäure	ergab	15 g Dioxymaleinsäure.
II.	„	„	200 g	„	„	48 g „
III.	„	„	200 g	„	„	31 g „

Phytochemische Reduktionen. X.

Reduktion von Glykolaldehyd zu Äthylenglykol.

Von

Carl Neuberg und Erwin Schwenk.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Nachdem es gelungen ist, die verschiedensten Aldehyde der aliphatischen, aromatischen und fettaromatischen Reihe durch Hefe zu reduzieren, war es von Interesse, das Verhalten des einfachsten Oxyaldehyds, des Glykolaldehyds, in dieser Hinsicht kennen zu lernen. Von einem höheren Homologon, dem Glycerinaldehyd, sowie dem isomeren Keton, dem Dioxyaceton, ist die Überführbarkeit in Glycerin schon bekannt[1]). Während die beiden Triosen durch ihre Gärbarkeit eine Beziehung zum Stoffwechsel der Hefe verraten, ist für die Diose, den einfachsten Zucker, ein solcher Zusammenhang nicht bekannt; denn es ist bisher nicht gelungen, den Glykolaldehyd in Gärung zu versetzen.

Wir fanden, daß der Glykolaldehyd doch von Hefe angegriffen wird, wenn auch nicht im Sinne einer alkoholischen Gärung, sondern durch Reduktion, wobei in Analogie mit den gewöhnlichen Aldehyden der entsprechende Alkohol, das Äthylenglykol, gebildet wird. Bei den Schwierigkeiten, welche die Aufarbeitung bietet, vermögen wir nichts darüber auszusagen, ob noch andere Produkte bei der Einwirkung der Hefe auf Glykolaldehyd entstehen. Die Überführung in Äthylenglykol gelang uns zu etwa 30 % der Theorie. Es war möglich, das Äthylenglykol selbst in nahezu reinem Zustande durch Destillation im Vakuum abzuscheiden und sein Vorliegen durch Rückoxydation zu Glykolaldehyd zu erweisen.

---

[1]) Oppenheimer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 89, 63, 1914.

Von manchen Autoren[1]) wird angenommen, daß nicht Formaldehyd, sondern dessen einfachstes Aldol, eben der Glykolaldehyd, das erste zuckerähnliche Material der Assimilation darstelle, das dann zu Hexose kondensiert werden soll. Daneben dürfte auch ein Übergang in die längst in der Natur aufgefundene Glykolsäure erfolgen, zu der als mögliches Umwandlungsprodukt nun auch das Äthylenglykol tritt. Dieses selbst kommt nach G. Trier[2]) in bestimmten Phosphatiden vor, und sein Skelett findet sich im Aminoäthylalkohol und im Cholin.

Experimenteller Teil.

Der zu den Versuchen benötigte Glykolaldehyd wurde durch Zersetzung reinster Dioxymaleinsäure (s. S. 112) in wässeriger Aufschwemmung bei 50 bis 60° nach Parnas und Baer[3]) hergestellt.

Zu dem lebhaft gärenden Ansatz von 250 g Rohrzucker, 250 g Oberhefe Rasse XII und 2500 ccm Leitungswasser wurden 10,1 g Glykolaldehyd in 50 ccm Wasser durch einen Tropftrichter zutropfen gelassen. Das Gärgut befand sich in einer etwa 8 l fassenden Flasche, die tagsüber in einem dauernd auf 37° gehaltenen Wasserbad stand. Da der Zucker nach 8 Stunden vergoren war, wurden noch 250 g Rohrzucker und 100 ccm Wasser hinzugegeben. Aus demselben Grund wurden im Laufe von 72 Stunden im ganzen noch 600 g Hefe, 250 g Zucker und 1 l Wasser hinzugesetzt. Es war auch dann noch ein schwaches Reduktionsvermögen vorhanden. Nun wurde von der Hefe abfiltriert. Das ganze Filtrat wurde, da beim Eindampfen Verluste an Glykol zu befürchten waren, am 8-Kugel-Birektifikator eingeengt. Der dickliche, braune Rückstand wurde mit absolutem Alkohol am Rückflußkühler auf dem Wasserbade ausgekocht und die Lösung nach mehrstündigem Stehen von der ausgefallenen Schmiere abgegossen. Diese wurde noch ein zweites Mal mit absolutem Alkohol ausgekocht und die vereinigten Alkoholauszüge auf dem Wasserbade am Birektifikator vom Sprit befreit. Der Rückstand wurde wieder mit absolutem Alkohol aufgenommen und mit dem halben Volumen wasser-

[1]) Siehe hierüber H. Fincke, diese Zeitschr. 61, 157, 1914.

[2]) G. Trier, Zeitschr. f. physiol. Chem. 86, 155, 1913.

[3]) J. Parnas und J. Baer, diese Zeitschr. 41, 412, 1912.

freien Äthers versetzt. Über Nacht setzte sich unter erheblicher Entfärbung ein flockiger Niederschlag zu Boden, von dem abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde am Wasserbade von Alkohol und Äther befreit und ebenfalls auf dem Wasserbad bei 50° im Vakuum möglichst getrocknet. Der ölige, braune Rückstand, der nicht mehr reduzierte, wurde mit absolutem Alkohol aufgenommen, die Lösung durch Zusatz von festem Kaliumcarbonat von sauren Produkten befreit und durch Zusatz von entwässertem Glaubersalz während 72 Stunden getrocknet. Nun wurde von den Salzen abfiltriert, mit wenig absolutem Alkohol nachgewaschen, und aus dem Filtrat der Alkohol verdampft. Der Rückstand wurde wieder mit 20 ccm wasserfreiem Alkohol aufgenommen und mit 10 ccm absolutem Äther gefällt. Über Nacht schied sich noch eine geringe Menge Schmiere aus, von der abgegossen wurde. Nun schritten wir zur Destillation, die in einem kleinen, etwa 30 ccm fassenden Fraktionierkölbchen mit tief angesetztem Hals ausgeführt wurde. Das Kölbchen befand sich in einem Glycerinbade, dessen Temperatur vorerst auf 50° gehalten wurde. In dieses Kölbchen wurde die nach obiger Beschreibung erhaltene alkoholisch-ätherische Lösung durch die Capillare eingesaugt, wobei unter langsamer Erhöhung der Temperatur auf 90° der Äther und ein Teil des Alkohols verdampfte. Nun wurde eine kleine Drehvorlage eingeschaltet und im Vakuum weiter destilliert. Der im Vakuum von 10 bis 11 mm bei 90 bis 100° übergehende Anteil wurde gesondert aufgefangen; die weitaus größte Menge dieser Fraktion ging scharf bei 94,5° über. Nach der Angabe von Anschütz[1]) kocht das Äthylenglykol im Vakuum von 11 mm bei 92 bis 92,6°. Dieses Produkt kann als hauptsächlich aus Äthylenglykol bestehend aufgefaßt werden; denn Glycerin, das natürlich in dem Gärgut zu erwarten ist und bei der Aufarbeitung des Äthylenglykols mit diesem wandern mußte, siedet unter dem Druck von 11 mm bei 169,4 bis 169,8°, also 77° höher. Tatsächlich stieg nach dem Überdestillieren des Äthylenglykols die Temperatur sehr rasch, aber aus dem beträchtlichen Rückstand entwickelten sich unter Zersetzung empyreumatische Dämpfe.

---

[1]) Anschütz-Reitter, Destillation unter vermindertem Druck. Bonn 1895, S. 58.

Das von 90 bis 100° übergegangene Destillat war dickflüssig, fast farblos, schmeckte süß mit brennendem Nachgeschmack und löste Kupferhydroxyd zu einer tiefblauen Flüssigkeit. Die Ausbeute an diesem Produkt betrug 3,0 g, etwa 30% der Theorie.

1 g desselben wurde mit 4,0 ccm 15%igem Wasserstoffsuperoxyd gemischt, ein Körnchen Ferrosulfat und einige Tropfen verdünnte Schwefelsäure zugegeben und das Ganze bei 28° stehen gelassen. Da die Oxydation selbst beim längeren Aufbewahren bei 37° nicht zu Ende kam, wurde schließlich nach Zugabe von weiteren 2,0 ccm Wasserstoffsuperoxyd eine halbe Stunde am Wasserbad erwärmt. Zu der erhaltenen Flüssigkeit, die schon in der Kälte sehr viel stärker reduzierte, als der vorhandenen kleinen Menge Ferrosulfat entsprach, wurde eine Lösung von 1 g p-Nitrophenylhydrazin in Essigsäure und etwas Natriumacetat zugegeben und wieder auf dem Wasserbad erwärmt. Von den sich abscheidenden Flocken wurde abgesaugt und das Filtrat in den Brutschrank von 37° gestellt. Nach 48 Stunden hatte sich eine weitere kleine Menge Osazon abgeschieden. Als das Filtrat hiervon nochmals mit einer Lösung von 1 g Nitrophenylhydrazin in Essigsäure und etwas Natriumacetat versetzt wurde, fiel ein heller rot gefärbter Niederschlag aus, von dem nach 48stündigem Stehen bei 37° abfiltriert wurde. Alle drei Fällungen wurden getrocknet und zusammen aus Nitrobenzol umkrystallisiert. Man erhielt so 0,7 g an kleinen dunkelroten Kryställchen, die in Pyridin mit tiefgelber Farbe löslich waren und durch Wasser als ziegelroter Niederschlag gefällt wurden. Sie schmolzen im Paraffinbad bei 308°. Die Analyse zeigte, daß reines p-Nitrophenylosazon des Glykolaldehyds vorlag.

0,1135 g gaben 25,6 ccm N bei 752 mm und 19,0°.

Berechnet für $C_{14}H_{12}N_6O_4$: 25,61% N; gefunden: 25,51% N.

Die Verbindung besaß die von Wohl und Neuberg[1]) angegebenen Eigenschaften.

---

[1]) A. Wohl und C. Neuberg, Ber. **33**, 3107, 1900.

Phytochemische Reduktionen. XI.

Die Umwandlung von Äthyldisulfid in Äthylmercaptan.

Von

Carl Neuberg und Erwin Schwenk.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Die bisher festgestellten phytochemischen Reduktionsvorgänge betreffen die Überführung von Aldehyd- in Alkoholgruppen, die Hydrierung von Thioaldehyd zu Mercaptan, die Umwandlung von Nitro-, Nitroso- und Hydroxylaminoresten in die Aminogruppe.

Diese Reduktionswirkung der lebenden Hefen konnten wir sowohl in der aromatischen als auch in der aliphatischen und fettaromatischen Reihe feststellen; sie ist — soweit geprüft — auch mit Hefenpräparaten zu erzielen, also vom Leben der Hefe trennbar.

Die außerordentliche Leichtigkeit, mit der die Hefen diese phytochemischen Reduktionen vollbringen, verleiht den Erscheinungen ein großes Interesse, und wir haben versucht, weitere hierher gehörige Beispiele ausfindig zu machen. Wir haben erwartet, daß die Reduktion von Disulfid zu Mercaptan mit besonderer Leichtigkeit durch Hefe ausführbar sei, angesichts des im Reagensglase sich so glatt vollziehenden Überganges der beiden Substanzen ineinander. Diese Voraussicht hat sich nicht als ganz zutreffend herausgestellt. Die Reduktion des Disulfids durch Hefe konnten wir zwar ausführen, doch nicht mit der erwarteten Leichtigkeit.

Zu den Versuchen wählten wir das Äthyldisulfid, da sein Siedepunkt (151^0) von dem des Äthylmercaptans (36^0) sehr verschieden ist. Die uns zur Verfügung stehenden unter-

gärigen Hefen waren nach Vorversuchen hier geeigneter als obergärige.

Im übrigen befolgten wir eine ähnliche Methodik, wie wir sie in den früheren Fällen angewendet haben[1]).

Experimentelles.

In einer 8-l-Flasche wurde eine Lösung von 250 g Rohrzucker in 2500 ccm Leitungswasser mit 250 g Unterhefe (Rasse U)[2]) zur Gärung gebracht. Sobald dieselbe lebhaft geworden war, wurden 3 g mehrfach destillierten, ganz reinen Äthyldisulfids (vom scharfen Siedepunkt 151°), gelöst in 10 ccm Alkohol, hinzugetropft. Mit dem Gärgefäß verbunden war ein System von vier Vorlagen. In jeder dieser Woulffschen Gaswaschflaschen befanden sich 125 ccm 3%iger Quecksilbercyanidlösung. Nach einiger Zeit trat in der ersten Waschflasche ein weißlicher Niederschlag auf, der sehr langsam an Menge zunahm und dabei schwach gelb wurde. Eine grüne oder schwärzliche Verfärbung, die bei der phytochemischen Reduktion des Thioacetaldehyds zu Äthylmercaptan auftritt und beigemengtem Schwefelwasserstoff ihre Entstehung verdankt, stellte sich nicht ein. Am zweiten Tage hatte die sich bald verlangsamende Gärung ganz ausgesetzt. Sie wurde durch Zugabe von 200 g Rohrzucker, 100 g Hefe U und 1 l Leitungswasser von 37° wieder in Gang gebracht. Dann wurden noch 15 g Äthyldisulfid, gemischt mit 5 ccm Alkohol, hinzugetropft. Der Niederschlag in der Vorlage nahm zu, allein die Gärung war am nächsten Tage abermals erloschen. Es wurde nun in einem besonderen Gefäß ein Gärungsgemisch von 200 g Rohrzucker, 1 l Wasser und 200 g Hefe U bereitet und nach erfolgter Angärung dem Hauptansatz zugefügt. Nach etlichen Stunden hörte die Gärung wieder auf. Während der ganzen Dauer des Versuchs war am Tage die Temperatur durch Einstellen des Gärgefäßes in ein Wasserbad auf 37° gehalten worden, während des Nachts Zimmertemperatur geherrscht hatte.

---

[1]) C. Neuberg und F. F. Nord, Ber. 47, 2264, 1914, und diese Zeitschr. 67, 46, 1914.

[2]) Die Hefe muß frisch sein, da wir bei Verwendung von älterer Hefe trotz Gärungsvermögens nur geringe Ausbeuten an Mercaptan erhielten.

Um in Lösung befindliches Äthylmercaptan in die Vorlagen überzutreiben, wurde schließlich das Gärgefäß in ein Wasserbad von 55 bis 60° gebracht und gleichzeitig aus der Bombe 20 Stunden lang Kohlensäure hindurchgeleitet. In der ersten Vorlage fand sich das gesamte Mercaptid vor, das am Schlusse des Versuchs flimmernde Krystalle bildete. Die nachfolgende Destillation des — wie erwähnt zuvor auf 60° erwärmten — Gärgutes ergab kein Äthylsulfhydrat mehr. Die gesamte Ausbeute an Quecksilbermercaptid belief sich auf 0,5 g, das sind 4% der Theorie.

Trotz des schönen Aussehens war dieses Quecksilbermercaptid noch nicht ganz rein. Die Analyse ergab etwas zuviel Quecksilber.

0,1020 g Substanz lieferten 0,0754 g HgS.

Gefunden:	Berechnet für $(C_2H_5S)_2Hg$:
65,00% Hg	62,15%

Dagegen gelang die Überführung dieses Mercuriäthylmercaptids in völlig reines Äthylmercaptanblei. Zu diesem Zwecke wurde das trockene Quecksilbersalz mit ca. 200 ccm 5%iger Salzsäure übergossen und das bei der Destillation entweichende Gas in 3%iger Bleiacetatlösung aufgefangen. Es traten sofort die charakteristischen citronengelben Wolken auf, die sich zu schönen Nädelchen verdichteten. Spuren des Bleisalzes ergaben in schärfster Weise die Mercaptanreaktionen mit Nitroprussidnatrium sowie mit Isatin plus konz. Schwefelsäure.

Wie die Analyse dartat, lag reines Äthylmercaptanblei vor.

0,1425 g gaben 0,1308 $PbSO_4$.

Gefunden:	Berechnet für $(C_2H_5S)_2Pb$:
62,70%	62,92%

Um uns zu vergewissern, ob die Umwandlung des Disulfids in Mercaptan mit dem Gärakt der Hefe zusammenhängt, wurde eine Kontrolle mit zuvor abgetöteter Hefe vorgenommen.

Zu diesem Zwecke wurde die Suspension von 250 g Hefe in 1250 ccm Wasser 2 Stunden im siedenden Wasserbade erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde eine Lösung von 250 g Rohrzucker in 1150 ccm Wasser hinzugesetzt, die zuvor durch Behandlung mit 50 ccm n-H_2SO_4 in der Wärme invertiert und sodann mit 50 ccm n-NaOH neutralisiert worden war.

Zu diesem Gemisch wurden 2 g Äthyldisulfid, gelöst in 10 ccm Alkohol, hinzugesetzt; dieser Ansatz wurde dann genau wie der Hauptversuch behandelt. Auch nach Durchleitung von Kohlensäure entstand in der $Hg(CN)_2$-Vorlage keine Trübung. Wir fügen hinzu, daß eine verdünnte alkoholische Lösung von Äthyldisulfid mit dem verwendeten Quecksilbercyanid keinen Niederschlag gab.

Aus den mitgeteilten Tatsachen geht hervor, daß gärende Hefe Äthyldisulfid zu Äthylmercaptan reduziert im Sinne der Gleichung:

$$\begin{array}{l} C_2H_5.S \\ \qquad | \\ C_2H_5.S \end{array} + H_2 = 2\,C_2H_5.SH.$$

Das Verhalten der α-Ketosäuren zu Mikroorganismen. III.

Die Fäulnis der d, l-Methyläthylbrenztraubensäure.

Von

Carl Neuberg und Bruno Rewald.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

In den ersten beiden Mitteilungen[1]) über diesen Gegenstand ist das Verhalten der Brenztraubensäure, der Oxalessigsäure und der α-Ketobuttersäure zu den Erregern der Fäulnis untersucht worden. Diese Frage bietet nach mehreren Richtungen Interesse. Einmal handelt es sich um dieselben Substanzen, die dem eigentümlichen Prozeß der zuckerfreien Gärung durch die Hefencarboxylase unterliegen. Andererseits sind unsere Kenntnisse von den Veränderungen der stickstofffreien Substanzen unter dem Einflusse von Bakterien überhaupt recht lückenhaft, und drittens darf es als wahrscheinlich gelten, daß die α-Ketosäuren auch bei der Fäulnis der Aminosäuren bzw. des Eiweißes als Zwischenstufen auftreten.

Die jüngst von C. Neuberg und W. H. Peterson[2]) beschriebene Vergärung der Methyläthylbrenztraubensäure durch Hefe hat ergeben, daß diese Ketocapronsäure, $C_4H_9.CO.COOH$, asymmetrisch gespalten wird und neben Kohlendioxyd verschiedene Amylderivate, überwiegend d-Amylalkohol, liefert.

Dieselbe racemische Methyläthylbrenztraubensäure,

$$\begin{matrix} CH_3 \\ C_2H_5 \end{matrix} \!\!> \overset{*}{C}H{-}CO{-}COOH,$$

haben wir nun der Fäulnis unterworfen und festgestellt, daß sie optisch aktive Valeriansäure (neben Ameisensäure)

---

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 67, 90 und 122, 1914.

[2]) C. Neuberg und W. H. Peterson, diese Zeitschr. 67, 32, 1914.

liefert. Der Verlauf der Reaktion entspricht demnach dem Verhalten der vorerwähnten anderen Ketosäuren bei der Fäulnis; denn auch diese geben, unter Abspaltung von einem bzw. von zwei Kohlenstoffatomen der Carboxylgruppen, in der Hauptsache die nächst niedrige flüchtige Fettsäure.

Die erhaltene Valeriansäure war die d-Methyläthylessigsäure, der angesichts der racemischen Natur des Ausgangsmaterials noch rund 70% inaktive Säure beigemischt waren.

Daneben trat in kleiner Menge eine gleichfalls dextrogyre Säure mit höherem Kohlenstoffgehalt auf, die vielleicht als nicht ganz reine und z. T. optisch aktive Capronsäure (d-Methyläthylpropionsäure) aufzufassen ist.

Die Methyläthylbrenztraubensäure ist die dem Isoleucin entsprechende Ketosäure, und man erkennt, daß das Verhalten von Amino- und Ketosäure bei der Fäulnis prinzipiell das gleiche ist. Bei der Eiweißfäulnis treten bekanntlich nicht unbedeutende Mengen optisch aktiver Valeriansäure und Capronsäure[1]) auf, als deren beider Muttersubstanz das Isoleucin zu betrachten ist[2]). Die mitgeteilten Ergebnisse erbringen einen neuen Beitrag zur Frage nach der Rolle der α-Ketosäuren als Zwischenstufen.

Von der Isolierung der gasförmigen Reaktionsprodukte, die sich in den früher geprüften Fällen überwiegend als Kohlensäure und Wasserstoff erwiesen haben, konnten wir absehen. Die Hauptreaktion vollzieht sich in folgendem Sinne:

$$\begin{matrix} CH_3 \\ C_2H_5 \end{matrix}\!\!>\!CH-CO-COOH + H_2O \rightarrow H.COOH + \begin{matrix} CH_3 \\ C_2H_5 \end{matrix}\!\!>\!CH-COOH.$$

Experimentelles.

18 g reine racemische Methyläthylbrenztraubensäure wurden in 500 ccm Wasser unter Zusatz von Soda bis zur neutralen Reaktion gelöst. Dazu wurde je ein Kryställchen KCl, $CaCl_2$, $FeCl_3$, K_2HPO_4, $MgSO_4$, sowie je ein größerer Krystall von $(NH_4)_2SO_4$, KNO_3 sowie von $KHCO_3$ gefügt. Alsdann wurde mit Wasser auf 1800 ccm aufgefüllt. Nach Impfung mit 8 ccm Salkowskischer Faulmischung wurde das Gemenge 33 Tage

---

[1]) C. Neuberg und E. Rosenberg, diese Zeitschr. 7, 178, 1907.
[2]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 37, 501, 1911.

im Brutschrank bei 37° belassen und von Zeit zu Zeit die verschwindende alkalische Reaktion durch Sodalösung wieder hergestellt.

Nach der angegebenen Digestionsdauer war kein Ausgangsmaterial mehr nachweisbar; also wurde die Faulmischung mit Schwefelsäure angesäuert und im Wasserdampfstrom destilliert, bis 8200 ccm übergegangen waren. 100 ccm besaßen davon eine Acidität = 8,0 ccm $^n/_{10}$-NaOH, die Gesamtmenge demnach eine solche von 656 ccm $^n/_{10}$-NaOH. Zur ganzen Quantität wurden alsdann 35 ccm 2 n-NaOH (ein kleiner Überschuß) gesetzt und die schwach alkalische Lösung auf dem Wasserbade eingeengt. Die restierende Krystallmasse wurde mehrmals mit 75 ccm 95%igem Alkohol ausgekocht. Die alkoholischen Auszüge wurden verdampft und der in wenig Wasser gelöste Rückstand mit Schwefelsäure angesäuert. Ohne Rücksicht auf die entstandene Ölschicht wurde erschöpfend mit Äther ausgeschüttelt und die ätherische Lösung nach scharfer Trocknung über geglühtem Glaubersalz am Birektifikator fraktioniert.

Bis 120° gingen 1,1 g einer Flüssigkeit über, die durch ihr Verhalten zu Silbernitrat und Sublimat einen erheblichen Gehalt an Ameisensäure erkennen ließ.

Dann stieg das Thermometer schnell, und bei 170 bis 177° destillierten fast 5 g eines dickflüssigen, sauren Liquidums über (Säure A), und bei 195 bis 197° sott abermals eine deutliche Fraktion im Gewichte von 1,3 g (Säure B).

Säure A wurde zunächst polarimetrisch untersucht; sie zeigte die Drehung: $[\alpha]_{D17} = +5{,}30^0$

$(\alpha = +4{,}98^0;\quad c = 100;\quad d = 0{,}939;\quad l = 1).$

1,0 ccm der Säure = 0,9386 g wurden alsdann in 10 ccm Wasser plus 10 ccm Alkohol gelöst; sie verbrauchten bei der Titration mit Phenolphthalein 91,8 ccm $^n/_{10}$-NaOH, während Valeriansäure, $C_5H_{10}O_2$, 92,0 ccm $^n/_{10}$-NaOH verlangt.

Ein Teil der Säure wurde in das Ammoniumsalz verwandelt und aus diesem in gewohnter Weise die Silberverbindung dargestellt.

0,2198 g Silbersalz gaben 0,1135 g Ag = 51,69%. Für $C_5H_9O_2Ag$ berechnet sich: Ag = 51,67%.

Dadurch ist die Säure A mit Sicherheit als eine Valeriansäure gekennzeichnet. Da reine d-Valeriansäure eine spez. Drehung

von + 16,4 bis + 18,7° (W. **Marckwald**) besitzt, so besteht die erhaltene Säure zu rund 30% aus der aktiven Form.

Die **Säure B** erwies sich bei der optischen Untersuchung gleichfalls als rechtsdrehend, und zwar betrug die Drehung im 1-dcm-Rohr: + 1,85° [1]).

Da für weitere Ermittelungen das Material nicht vorhanden war, wurde nur über die Ammoniumverbindung das Silbersalz bereitet und analysiert.

0,2014 g Silbersalz lieferten 0,0960 g Ag = 47,66%,
0,2826 g " " 0,1346 g Ag = 47,63%.

Für capronsaures Silber, $C_6H_{11}O_2Ag$, berechnet sich 48,43% Ag; wie man sieht, liegen dieser Zahl die gefundenen Werte nicht sehr fern.

---

[1]) Daraus berechnet sich eine spez. Drehung von ungefähr + 2°. Für reine synthetische d-Methyläthylpropionsäure haben C. **Neuberg** und B. **Rewald** (diese Zeitschr. 9, 403, 1908) früher die Drehung $[\alpha]_D = +8,98°$ festgestellt.

Veränderungen im Alkohol- und Aldehydgehalt von Hefen bei der Aufbewahrung und bei der Autolyse.

Von

Carl Neuberg und **Erwin Schwenk.**

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

In den neueren Anschauungen über den Verlauf der alkoholischen Gärung spielt der Acetaldehyd als Zwischenprodukt eine Rolle. Es ist deshalb wichtig, über das Vorhandensein und das Schicksal des Acetaldehyds in Hefen und Hefenpräparaten orientiert zu sein.

Da es feststeht, daß Acetaldehyd und Äthylalkohol unter der Einwirkung von Hefen unter verschiedenen Bedingungen ineinander übergehen[1]), so können Betrachtungen über das Vorkommen von Acetaldehyd in Hefen und über die Veränderungen dieses Acetaldehydgehaltes nur im Zusammenhange mit dem Verhalten des Äthylalkohols vorgenommen werden.

Vor einiger Zeit haben Neuberg und Kerb[2]) die allem Anschein nach bis dahin übersehene Tatsache festgestellt, daß die Preßhefen des Handels stets Alkohol enthalten. Die Menge desselben belief sich bei den von ihnen untersuchten Heferassen des Instituts für Gärungsgewerbe in Berlin z. B. auf 0,8 bis 0,9 °/₀, und auch F. Hayduck[3]) stellte in diesem Material die Anwesenheit von Alkohol fest.

---

[1]) C. Neuberg und Joh. Kerb, Zeitschr. f. Gärungsphysiol. **1**, 114, 1912; diese Zeitschr. **58**, 169, 1913. — S. Kostytschew und E. Hülbenet, Zeitschr. f. physiol. Chem. **79**, 359, 1912; **85**, 408, 1913. — A. v. Lebedew und N. Griaznoff, Ber. **45**, 3266, 1912.

[2]) C. Neuberg und Joh. Kerb, Zeitschr. f. Gärungsphysiol. **1**, 120, 1912; Ber. **46**, 2226, 1913; diese Zeitschr. **58**, 406, 1913.

[3]) F. Hayduck, Jahrb. der Versuchs- u. Lehranstalt für Brauerei in Berlin. **1913**, S. 536.

Bei einer Nachprüfung der Angaben Kostytschews sind jüngst E. Buchner, K. Langheld und S. Skraup[1]) zu dem Ergebnis gelangt, daß verschiedene von diesem Autor beobachtete Aldehydbildungen nur auf eine sekundäre Alkoholoxydation zurückzuführen sind. Sie stimmen in diesem Punkt mit den früher von C. Neuberg und Joh. Kerb[2]) begründeten Anschauungen überein.

Nicht jedoch kann man der Auffassung beipflichten, daß jedes Auftreten von Aldehyd in der Hefe auf Oxydation durch atmosphärischen Sauerstoff — sei es unter Mitwirkung von Oxydasen oder ohne solche — beruht. Die Aldehydentstehung unter anaeroben Bedingungen haben C. Neuberg und Joh. Kerb[3]) dargetan, und im folgenden teilen wir Versuche mit, die weitere Belege für die Aldehydbildung ohne Sauerstoffzufuhr darstellen.

1. Zunächst fanden wir, in Bestätigung der Angaben von Neuberg und Kerb, daß ganz frische Hefen keinen Acetaldehyd enthalten und daß man durch Lagern schwach aldehydhaltig gewordene Hefe durch Waschen mit Leitungswasser und nachfolgendes Zentrifugieren praktisch aldehydfrei machen kann.

2. Bewahrt man nicht besonders gewaschene, lebende Hefe in verschlossenen, mit Leukoplast gut verklebten und noch mit Paraffin gedichteten, fast bis zum Rand gefüllten Büchsen im Eisschrank bei +5 bis +10° auf, so nimmt nach quantitativen Bestimmungen sowohl der Gehalt an Acetaldehyd[4]) als auch an Alkohol bei der Lagerung der Hefen sehr deutlich zu. Es ist nicht sehr wahrscheinlich, daß beim Fehlen jeglicher Ventilation unter diesen Umständen eine Luftoxydation von Äthylalkohol stattfindet, den man sich doch in der gleichmäßig zusammengepreßten Hefenmasse verteilt denken muß.

3. Bei der Autolyse von frischer Hefe sowie von Trockenhefe in mit Kohlensäure gesättigtem Wasser

---

[1]) E. Buchner, K. Langheld und S. Skraup, Ber. 47, 2550, 1914.

[2]) Diese Zeitschr. 43, 494, 1912; 58, 158, 1913; 64, 251, 1914.

[3]) C. Neuberg und Joh. Kerb, Ber. 47, 2730, 1914.

[4]) Ob die Hefen des Handels keinen oder geringe Mengen von Acetaldehyd von vornherein enthalten, hängt davon ab, wie gut sie vor der Verpackung gewaschen und abgepreßt sind; ferner hat ihr Alter (s. oben) einen Einfluß hierauf.

stieg gleichfalls der Gehalt an Alkohol und Acetaldehyd an.

In keinem Falle war eine Korrelation zwischen der Neubildung von Acetaldehyd und dem Verhalten des Alkohols nachweisbar, indem die Zunahme des Äthylalkohols weit größer war als der Zuwachs an Acetaldehyd.

Experimentelles.

I.

Viermal je 100 g frisch bezogene Hefe der Rasse XII wurden in Zentrifugengefäßen mit je 300 ccm Leitungswasser gut verrührt und eine halbe Stunde lang abgeschleudert. Die Waschflüssigkeit wurde abgegossen und hier wie in den folgenden Versuchen am gut wirkenden Schlangenkühler unter starker Eiskühlung abdestilliert. Die ersten 100 ccm wurden durch weitere anreichernde Destillation auf 5 ccm gebracht. Mit diesen fiel die Probe auf Acetaldehyd nach Rimini[1]) schwach positiv aus. Der Heferückstand wurde mit je 200 ccm Leitungswasser auf 100 g Hefe noch dreimal an der Zentrifuge gewaschen.

200 g der so vorbehandelten Hefe wurden in 1 Liter vorher ausgekochtem und kalt mit CO_2 gesättigtem Wasser angerührt und mit Wasserdampf destilliert. Das aufgefangene Flüssigkeitsvolumen betrug 500 ccm. Diese wurden wieder destilliert und die ersten 200 ccm aufgefangen. In einem aliquoten Teile des Destillats wurde der Aldehyd nach den Angaben von O. v. Fürth und D. Charnass[2]) titriert. Die mitgeteilten Werte sind das Mittel aus jeweils 2 oder 3 gut übereinstimmenden Einzelanalysen.

---

[1]) Jüngst haben sich Fernbach und Schoen (Annal. de l'Institut Pasteur 28, 701, 1914) gegen diese Bezeichnung der Nitroprussidreaktion gewendet, indem sie Simon als den Urheber bezeichnen. In Wirklichkeit liegt die Angelegenheit folgendermaßen: L. Simon hat angegeben (Ch. C. 98, I, 238), daß Acetaldehyd mit Nitroprussidnatrium und Trimethylamin eine blauviolette Färbung gibt. Indessen reagieren rein tertiäre Amine nach Rimini überhaupt nicht, sondern nur sekundäre. Rimini (Ch. C. 98, II, 277) hat dies erkannt; seitdem ist das Diäthylamin für die Probe eingeführt; L. Lewin (Ber. 32, 3389, 1899) hat das Piperidin empfohlen.

[2]) O. v. Fürth und D. Charnass, diese Zeitschr. 26, 207, 1910.

100 g der gereinigten Hefe XII enthielten: 0,00044 g Aldehyd.

II.

A. Aus einer frisch bezogenen, vollständig gefüllten Büchse derselben Oberhefe XII wurden 200 g entnommen, mit CO_2-gesättigtem Wasser übergossen und in der beschriebenen Weise mit Wasserdampf destilliert.

Der Gehalt an präformiertem Aldehyd betrug in 100 g nicht vorbehandelter Hefe XII: 0,00175 g; er war also 4mal so hoch als nach dem Waschen dieser Hefe.

B. Sofort nach der Entnahme der Hefe wurde die erwähnte Büchse sorgfältig mit Isolierband und Paraffin verschlossen. Nach neuntägigem Stehen im Eisschranke wurde die Büchse geöffnet; 200 g des Inhalts wurden sofort wie sub A. behandelt. Der Aldehydgehalt war jetzt auf das 4,5fache des früheren Betrags gestiegen; er belief sich für 100 g gelagerte Hefe XII auf: 0,00792 g.

C. Es wurde nunmehr ein Versuch mit einer untergärigen Hefe, Rasse UM, angestellt, der völlig dem Versuch A entsprach. Die Titration ergab in 100 g der bezogenen Hefe UM an vorgebildetem Aldehyd: 0,0022 g.

D. Nach sechstägigem Stehen in wie oben verschlossener Büchse war die Aldehydmenge auf den dreifachen Betrag angewachsen und machte 0,00704 g aus.

E. Mit einer neuen Portion der Hefe XII wurde wie sub A verfahren. Dieses Mal wurde außer dem Aldehyd auch der präformierte Alkohol bestimmt.

α) Die Titration des Aldehyds ergab in 100 g Hefe 0,00198 g.

β) Die Bestimmung des Alkohols wurde nach den verbesserten Angaben von Kostytschew[1]) ausgeführt. Im Gegensatz zu der alten Vorschrift dieses Autors, die sich als unbrauchbar erwiesen hat[2]), gab die neue bei Kontrollversuchen unter den hier in Betracht kommenden Konzentrationsverhältnissen befriedigende Resultate. Im vorliegenden Versuche fanden wir in 100 g Hefe XII an Alkohol 0,36 g.

[1]) S. Kostytschew, diese Zeitschr. **64**, 249, 1914.

[2]) C. Neuberg und Joh. Kerb, diese Zeitschr. **43**, 494, 1912; **58**, 167, 1913; **64**, 254, 1914. Ferner A. v. Lebedew und N. Griaznoff, Ber. **45**, 3263, 1912.

F. Nach elftägigem Stehen desselben Materials unter den erwähnten Bedingungen wurde gefunden in 100 g Hefe XII:

α) an Aldehyd . . . 0,00461 g,
β) an Alkohol . . . 1,44 g.

Wie ersichtlich hat der Alkohol um mehr als 1 g beim Lagern von 100 g Hefe zugenommen, während die Menge des Aldehyds nur um 0,002 g angestiegen war.

G. In einem Falle haben wir im Laufe der Aufbewahrung eine Abnahme des präformierten Aldehyds und wiederum eine Vermehrung des Alkohols gefunden, und zwar bei der Unterhefe UM. Zunächst enthielten 100 g dieser Hefe

α) an Aldehyd . . . 0,0033 g,
β) an Alkohol . . . 0,77 g.

H. Nach sechstägigem Stehen im Eisschrank fanden wir in 100 g Hefe UM

α) an Aldehyd . . . 0,0019 g,
β) an Alkohol . . . 1,86 g.

J. Wir teilen auch einen Versuch mit einer Hefe (Rasse U) mit, die bei der Inangriffnahme nach den Angaben des Instituts für Gärungsindustrie schon 5 Tage alt war. Das Experiment zeigt, daß in der gealterten Hefe jene Vorgänge offenbar schon abgelaufen sind, die man bei der Verwendung ganz frischer Hefen in der Änderung des Aldehyd- und Alkoholgehaltes verfolgen kann. 100 g dieser Hefe U enthielten

α) an Aldehyd . . . 0,0035 g,
β) an Alkohol . . . 1,73 g.

K. Nach siebentägigem Stehen desselben Materials im Eisschrank waren diese Werte fast unverändert. Der Gehalt von 100 g Hefe U

α) an Aldehyd betrug . . . 0,0040 g,
β) der an Alkohol . . . . 1,74 g.

III.

A. Die 200 g Hefe, die bei der sub I. beschriebenen Waschung verblieben waren, wurden mit 1 Liter vorher ausgekochtem und mit Kohlensäure gesättigtem Wasser unter Zugabe von 50 ccm Chloroform in einer Stöpselflasche im Brut-

schranke bei 37° zur Autolyse angestellt. Nach achttägiger Digestion wurden unter den üblichen Vorsichtsmaßregeln 500 ccm abdestilliert. Von dem mit übergegangenen Chloroform wurde im Scheidetrichter getrennt und die Chloroformschicht zweimal mit je 100 ccm Wasser ausgeschüttelt. Die so von Chloroform möglichst befreite Flüssigkeit wurde durch anreichernde Destillation auf 200 ccm gebracht; die noch in Lösung befindlichen Chloroformspuren haben keinen Einfluß auf die Acetaldehydbestimmung. Die Ermittlung des Aldehydgehaltes ergab eine Zunahme auf fast das Zehnfache des Anfangswertes. 100 g Hefe lieferten an Aldehyd 0,0043 g.

B. Weitere 200 g derselben Hefe XII wurden ebenso wie oben ausgewaschen, dann mit 1 l CO_2-gesättigtem, vorher ausgekochtem Wasser und mit 50 ccm Chloroform angesetzt. Die Autolyse wurde dieses Mal auf 14 Tage ausgedehnt. Die Zunahme des Aldehyds war sehr deutlich. 100 g Hefe enthielten 0,0122 g.

C. 200 g einer anderen Sendung Hefe XII wurden mit Wasserdampf destilliert. Im angereicherten Destillat wurden in üblicher Weise die Aldehyd- und die Alkoholmenge bestimmt. 100 g Hefe enthielten

α) an Aldehyd . . . 0,00088 g,
β) an Alkohol . . . 0,47 g.

D. Die gleichen Bestimmungen führten wir nach 5 tägiger Autolyse derselben Hefenprobe aus, die dieses Mal unter Zusatz von 0,5 % NaF vor sich gegangen war. 100 g Hefe enthielten dann

α) an Aldehyd . . . 0,0062 g,
β) an Alkohol . . . 0,63 g.

E. Zur Ergänzung haben wir schließlich noch die Trockenhefe (von Schroder, München) herangezogen, die wir vorher zwecks Entfernung von anhaftenden Aldehyd- und Alkoholmengen 30 Stunden im Faust-Heimschen Apparate bei 22° getrocknet hatten. 100 g dieses Materials wurden in 1 l mit CO_2 gesättigtem, vorher ausgekochtem Wasser verteilt und in der üblichen Weise anreichernd destilliert. Sie enthielten

α) an Aldehyd . . . 0,00176 g,
β) an Alkohol . . . 0,029 g.

F. 100 g desselben Materials wurden in 1 l ausgekochtem und mit CO_2 gesättigtem Wasser unter Zugabe von 1% NaF einer 11 tägigen Autolyse bei 38° unterworfen. Nach dieser Zeit ergab die Aufarbeitung

α) an Aldehyd . . . 0,014 g,
β) an Alkohol . . . 0,172 g.

Die ermittelten Tatsachen erlauben wohl folgende Schlußfolgerungen.

Beim Aufbewahren der Hefen im frischen Zustande ruhen keineswegs die chemischen Umsetzungen, insbesondere findet eine in den meisten Fällen recht deutliche Zunahme des Alkohols statt. Zumeist wächst auch die Menge des Aldehyds. Daß sie in einem Falle gesunken ist, kann nicht wundernehmen, da ja die Umwandlung der Aldehyde durch Hefe bekannt ist. Auch bei den Autolysen erfolgen Änderungen im Aldehyd- und Alkoholgehalt, gleichfalls in der Richtung einer Vermehrung beider Substanzen. Man darf wohl unbedenklich annehmen, daß es sich hier stets um Acetaldehyd und Äthylalkohol handelt, wenngleich die Titrationsmethoden an sich darüber nichts aussagen. Bemerkenswert erscheint, daß der Aldehyd und Alkohol von der Hefe relativ fest gehalten werden; denn selbst in den gewaschenen Proben sowie in der bei 22° längere Zeit getrockneten, staubenden Trockenhefe bleiben immerhin deutliche Mengen nachweisbar.

Zur Frage der Beziehung von Carboxylase zu Zymase

Von

Carl Neuberg.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Alb. Klöcker[1]) hat im Jahre 1913 in einer sehr bemerkenswerten Mitteilung eine Reihe neuer Hefenvarietäten beschrieben, die Traubenzucker und seine gärfähigen Isomeren sowie Saccharose und Maltose nicht oder bei sehr langer Einwirkung ganz schwach umsetzen.

Da ich durch die Liebenswürdigkeit des Herrn Prof. Klöcker in den Besitz einiger dieser Mikroorganismen gelangt bin, konnte ich an diesem Material den Gedanken verfolgen, ob mit der mangelnden zymatischen Wirkung ein Fehlen der Carboxylase einhergeht. Das ist der Fall. Wie bei den Kulturhefen die Fähigkeit zur Carboxylase- und Zymasegärung völlig parallel gehen, so fehlt bei den Pseudosaccharomyceten das Vermögen zur Einwirkung auf Zucker und Brenztraubensäure.

Zur Verfügung standen mir 3 Pseudosaccharomycesarten, die verschiedenen Weltteilen entstammten: Ps. germanicus (Harz), Ps. javanicus (Java) und Ps. indicus (Himalaya).

Die Versuche wurden in der Weise angestellt, daß dünne, schmale Eudiometer von 8 cm Länge und 3 mm Durchmesser mit einer $^{m}/_{2}$-Glucoselösung, bez. mit dem Gemisch von m-Brenztraubensäure + m-K_2HPO_4 gefüllt und nach Beschickung mit 0,1 g Hefenmaterial bei 28° über Quecksilber aufbewahrt wurden. Ferner wurden drei ebensolche Versuche mit $^{m}/_{10}$-freier Brenztraubensäure vorgenommen.

---

[1]) Alb. Klöcker, Recherches sur les organismes de fermentation. Compt. rend. des travaux du Labor. de Carlsberg 10, 285, 1913.

Keine der drei Hefen rief unter den gewählten Bedingungen weder in Traubenzucker- noch in Brenztraubensäurelösung eine sichtbare Gärung hervor. Innerhalb 4 Tagen hatte sich in den Röhrchen mit Pseudosaccharomyces germanicus je eine kleine Gasblase angesammelt. Nach dieser Zeit wurde in sämtliche Eudiometer je 0,05 g Kulturhefe Rasse K eingebracht. Überall trat schnell typische Gärung ein; das zeigt, daß keine irgendwie gärungswidrigen Stoffe zugegen waren, sondern daß das Verhalten der Pseudosaccharomyceten gegen Brenztraubensäure gleichfalls auf Carboxylasemangel beruht.

Kofermentartige Wirkung von Salzen der α-Ketosäuren.

Von

Carl Neuberg und Erwin Schwenk.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie, Berlin-Dahlem)

Mit dem Namen Koenzym bezeichnet man eine Substanz, die das Gärungsferment Zymase stets begleitet und unerläßlich für das Zustandekommen der alkoholischen Gärung ist.

Durch eine Reihe von Maßnahmen kann man Enzym und Koenzym bis zu einem gewissen Grade trennen. Bei der Dialyse durch Pergament (Buchner und Antoni)[1]) verliert Hefepreßsaft (auch Hefemacerationssaft) sein Gärvermögen für Traubenzucker. Ins Dialysat geht eine kochbeständige Substanz über, die unter vermindertem Druck eingedampft und zur Trockne gebracht werden kann und dann die Eigenschaft besitzt, im Verein mit dem nicht dialysierten Anteil des Hefesaftes die alkoholische Gärung zu erregen. Diese Trennung kann auch durch einen anderen Vorgang bewirkt werden, der gleichfalls die verschiedene Molekulargröße von Ferment und Koferment benützt: es ist dies die Filtration durch ein Chamberland-Martin-Filter (Harden und Young). Durch dieses wandert unter Druck das Koenzym hindurch, während die Zymase samt den übrigen Fermenten und Kolloiden der Hefe (Eiweißkörpern, Polysacchariden usw.) auf dem Filter zurückbleibt. Auch bei dieser Art der Trennung vermögen die wiedervereinten Saftanteile zymatisch zu wirken, während jede Fraktion für sich unwirksam ist. Es besteht also eine gewisse Analogie zu verschiedenen Vorgängen bei den Immunitätserscheinungen. Das beständige

[1]) Die gesamte Literatur findet sich bei A. Harden, Monogr. Alkohol. Ferment. **1911**, S. 55—63.

Koenzym entspricht etwa dem Amboceptor, das empfindlichere Ferment dem Komplement.

Das Koferment kann nicht nur durch Filtration des Hefesaftes gewonnen werden, sondern auch, wenn man auf die gleichzeitige Erhaltung der Zymase verzichtet, durch Kochen von Hefesaft sowie von Hefe selbst (Harden und Young, Buchner und Klatte). Man erhält so Kochsaft bzw. Hefeextrakt. Im Filtrat der koagulierten Hefebestandteile befindet sich das Koenzym, das bei dieser Art der Bereitung ebenfalls durch vorsichtige Konzentration im festen Zustande gewonnen werden kann.

Offenbar ist das Koenzym ein leicht löslicher Körper, da es durch einfaches Auslaugen getrockneten Hefen bei Zimmertemperatur entzogen werden kann. In längerer Berührung mit Hefesaft geht jedoch das Koenzym zugrunde, besonders dann, wenn der Hefesaft keine Gärarbeit leistet, d. h. nicht mit Zucker in Berührung ist (Harden und Young). Man muß daraus folgern, daß im Hefesaft ein Agens vorhanden ist, das Koenzym zerstört und daß dieses Agens weniger wirksam ist, wenn gleichzeitig eine alkoholische Gärung abläuft. Es wäre auch denkbar, daß durch diese alkoholische Gärung kleine Mengen von Koferment neu entstehen. Unbeschränkt ist jedoch die schützende Wirkung des Zuckers nicht, denn bekanntlich gelangt die zellfreie Gärung unter bestimmten Konzentrationsverhältnissen zum Stillstand, ehe noch aller Zucker umgesetzt ist. Wenn dann gekochter Hefesaft, d. h. Koenzym, hinzugefügt wird, kommt der erschöpfte Hefesaft wieder in Tätigkeit, und man kann dieses Spiel mehrere Male erneuern.

Ähnliche Wirkungen entfalten bekanntlich die Phosphate; allein es hat sich bald gezeigt, daß der nächstliegende Gedanke, im Koenzym Phosphate zu erblicken, nicht zutrifft (Harden und Young). Die Phosphate sind natürlich auch dialysabel, kochbeständig und extrahierbar; durch Veraschung verliert jedoch das Koenzym seine Wirksamkeit und es kann weder durch phosphorsaure Salze noch durch einfache Phosphatgemische ersetzt werden. Auch organische Phosphorverbindungen, wie die am Gärungsvorgange selbst beteiligte Hexosephosphorsäure, wie das Phytin (Inositphosphorsäure), Glycerophosphate und Lecithin haben nicht die Funktionen des Ko-

enzyms (Buchner und Klatte, Harden und Young, v. Euler und Bäckström). Die natürlichen Kofermentlösungen enthalten aus der Hefe stammende Mengen von freier und gebundener Phosphorsäure; von diesen können sie durch Behandlung mit Bleiacetat bei neutraler Reaktion befreit werden, ohne daß die Koenzymwirkung erlischt, obzwar Anteile des Koenzyms durch Bleiacetat niedergeschlagen werden (Harden und Young).

Durch Alkohol wird das Koenzym aus Kochsaft nicht oder nur unvollständig gefällt, und auch Aceton schlägt es schwierig nieder (Buchner und Duchaček).

Dem Angriff von starkem Alkali sowie von Säuren wiedersteht das Koenzym nicht (Buchner und Haehn).

Das vorerwähnte natürliche Verschwinden in Macerationssäften weist auf die Tätigkeit eines Ferments hin, da aufgekochte Hefesäfte ihre Kofermenteigenschaften lange bewahren. Die proteolytischen Fermente der Hefesäfte dürften hierfür kaum allein verantwortlich gemacht werden (Buchner und Klatte); denn eine nachträgliche Verdauung gekochter Hefesäfte vernichtet das Koferment nicht. Dagegen übt das Fermentgemisch von Rizinussamen (Buchner und Haehn) eine schädigende Wirkung auf das Koenzym aus. Eine solche macht sich auch geltend, wenn die Koenzymlösungen wiederholt zum Sieden gebracht oder anhaltend gekocht werden (Buchner und Haehn).

Die früher beschriebene stimulierende Wirkung, die in ausgeprägtem Maße kleinen Mengen von Salzen der α-Ketosäuren eigen ist[1]), legte den Gedanken nahe, das Aktivierungsvermögen, das diese Salze auf den Gesamtvorgang der alkoholischen Gärung ausüben, mit dem Aktivierungsvermögen durch das Koferment in Zusammenhang zu bringen. Die ersten Versuche, koenzymfreien Hefesäften oder durch Auslaugen von Koenzym befreiten Trockenhefen durch Zusatz wechselnder Mengen einzelner ketosaurer Salze die zymatische Kraft wiederzugeben, schlugen fehl. Erst als das Gemisch einer größeren Reihe von ketosauren Salzen und Dikaliumphosphat verwendet wurde, hatten wir einen Erfolg zu verzeichnen. Es gelang uns, die nicht oder nur ganz schwach gärenden koenzymfreien Hefepräparate durch einen

[1]) C. Neuberg, Diese Zeitschr. 71, 75 u. 83, 1915.

Zusatz dieser künstlichen Aktivatoren zu einer Vergärung von Traubenzucker und auch von Rohrzucker zu veranlassen. Freilich ist die wiederhergestellte Gärkraft bei weitem nicht die volle des nativen Macerationssaftes oder der ursprünglichen Trockenhefe. Auch ist die absolute Rate der Vergärung keineswegs quantitativ. Aber der Effekt ist immerhin so ausgesprochen, daß man an eine Mitwirkung der ketosauren Salze bei der Tätigkeit des Koenzyms durchaus denken muß. Auch die Gegenwart von anorganischen einfachen Phosphaten hat sich als unbedingt erforderlich erwiesen[1]).

Daß die Wirkung nicht die volle des natürlichen Koenzyms ist, kann ja die verschiedensten Ursachen haben. Einmal können in unseren künstlichen Aktivatorengemischen absolut wichtige Ketosäuren fehlen, dann kann auch das Mengenverhältnis der Bestandteile von ausschlaggebender Bedeutung sein. Hinzu kommt, daß nach v. Euler und Berggren, zitiert nach Hagmann[1]), 2 verschiedene Koenzyme vorzukommen scheinen.

Die ketosauren Salze, die wir verwendet haben, waren die Kalium- bzw. Calciumsalze folgender Verbindungen: Brenztraubensäure, α-Ketobuttersäure, α-Ketoisovaleriansäure, α-Ketocapronsäure (Methyläthylbrenztraubensäure), Phenylglyoxalsäure, Phenylbrenztraubensäure, p-Oxyphenylbrenztraubensäure, Oxybrenztraubensäure, Oxalessigsäure (Ketobernsteinsäure), und α-Ketoglutarsäure. Wie man sieht, sind dieses die Ketosäuren, die sich fast ausnahmslos von den wichtigen im Eiweißmolekül vorkommenden Aminosäuren ableiten, und zwar sind sie Derivate von: Alanin, Aminobuttersäure, Valin, Isoleucin, Phenylglykokoll, Phenylalanin, Tyrosin, Serin, Asparaginsäure und Glutaminsäure.

Nach den Anschauungen, die früher (vgl. S. 84) entwickelt worden sind, dürfte es sich um ein automatisches Ineinandergreifen von Kohlenhydrat- und Eiweißstoffwechsel der Gärungsorganismen handeln. Wenn man die Anschauung gelten lassen will, daß die Hefe die alkoholische Gärung nur zum Zwecke des Energiegewinnes leistet, mit dessen Hilfe sie die Synthese ihres Körpereiweißes vollbringt, also ihr Dasein und ihren Fort-

---

[1]) Anm. bei der Korr. Im Einklange mit einer jüngst von S. Hagmann (diese Zeitschr. 69, 403, 1915) aus v. Eulers Laboratorium gemachten Mitteilung.

bestand sichert, so dürften andererseits wieder die ersten Stufen des oxydativen Proteinumsatzes bzw. des Aminosäurenabbaus, eben die α-Ketosäuren, die natürlichen Aktivatoren für den geregelten Ablauf der alkoholischen Gärung darstellen.

Überblickt man von diesem Standpunkte aus, die bekannt gewordenen Eigenschaften des Koferments, so sieht man, daß sie im großen und ganzen mit der Auffassung vereinbar wären, daß es sich hier um Salze der α-Ketosäuren, vielleicht auch um Spuren der durch natürliche Moderatoren gepufferten freien Säuren selber handelt.

Dialysierbarkeit, leichte Extrahierbarkeit sowie Kochbeständigkeit kommen den genannten Substanzen selbstverständlich zu. Die Widerstandsfähigkeit gegen Erhitzen sowie gegen Säuren und Basen ist genau wie beim natürlichen Koferment begrenzt und findet ihre Erklärung in der Reaktionsfähigkeit dieser Verbindungen. Durch Alkohol und Aceton sind die Salze der α-Ketosäuren ebenfalls nur sehr unvollständig aus ihren wässerigen Lösungen fällbar, durch Bleiacetat werden sie — je nach Konzentration und Reaktion — auch zum Teil niedergeschlagen.

Der Verbrauch des Koenzyms bei der zellfreien Gärung würde im α-Ketosäurencharakter eine Erklärung finden können; denn diese Substanzen unterliegen natürlich der Wirkung der Hefencarboxylase und werden also durch dieselbe allmählich zerstört. Daß bei der Vergärung mit lebender Hefe keine Erschöpfung an Koferment eintritt, würde seine ungezwungene Deutung in dem Umstand erfahren, daß im Kreislauf des Aminosäurenstoffwechsels die α-Ketosäurenstufe sicher beim Abbau, vielleicht auch beim Aufbau durchlaufen wird.

Wenn eine echte Lipase bei dem Ricinussamen das kofermentzerstörende Agens ist — es könnte ja aber auch ein ganz anderes Enzym dieser Samen im Spiele sein — so würde auch dieser Umstand nicht gegen die vorgebrachte Auffassung sprechen; denn es wäre ja durchaus denkbar, daß esterartige Verbindungen der Ketosäuren, die gespalten oder unter dem synthetischen Einflusse der Lipase gebildet werden, im Spiele sind. Die relative Resistenz gegen Tryptasen steht wiederum mit der Auffassung als Ketosäurengemisch im Einklange.

Wir haben schließlich versucht, im Koferment Ketosäuren nachzuweisen, allerdings bisher ohne Erfolg. Die einfachste Probe, die Prüfung mit Nitroprussidnatrium, gibt ein schwach positives Resultat. Allerdings ist diese Reaktion weder spezifisch, noch kommt sie überhaupt den höheren Ketosäuren zu.

Die Untersuchungen auf diesem Gebiete beabsichtigen wir fortzusetzen.

Experimentelles.

Die Versuche wurden so angestellt, daß die nachstehend einzeln beschriebenen Ansätze in zugleich mit Quecksilber beschickte Eudiometerröhren von etwa 35 ccm Fassungsraum eingebracht wurden. Dann wurden die umgekehrten Röhren in eine Quecksilberwanne eingetaucht, an einem Stativ befestigt und die ganze Apparatur in einen Brutschrank bei 28° gestellt.

Als „koenzymfreie" Materialien kamen zur Anwendung:

a) Dialysierte Macerationssäfte aus getrockneter Hefe UM und K. Der Saft war im Eisschrank unter Zusatz von Toluol 28 Stunden lang gegen vielfach gewechseltes Leitungswasser dialysiert.

b) Mit Wasser ausgelaugte Trockenhefe UM, die nach den Angaben von Harden[1]) in Wasser suspendiert und jedesmal abzentrifugiert war. Schließlich wurde die abgeschleuderte Hefe in Aceton eingetragen, abgesaugt, mit Aceton nachgewaschen und im Vakuum getrocknet.

Versuch 1.

A. 20,0 ccm dialysierter Saft aus Hefe UM,
10,0 „ $^m/_2$-Glucoselösung,
1,0 „ eines Gemisches, das die Salze sämtlicher oben angeführten α-Ketosäuren in m-Lösung enthielt und im Gehalt an K_2HPO_4 molekular war (Salzgemisch),
0,5 „ Toluol,
0,5 „ Chloroform.

B. 20,0 ccm dialysierter Hefesaft,
10,0 „ $^m/_4$-Rohrzuckerlösung,
1,0 „ m-Salzgemisch,

[1]) A. Harden, Biochem. Journ. 7, 215, 1913.

0,5 ccm Toluol,
0,5 " Chloroform.

C. 20,0 ccm dialysierter Hefesaft,
10,0 " $^m/_2$-Glucoselösung,
1,0 " Wasser,
0,5 " Toluol,
0,5 " Chloroform.

D. 20,0 ccm dialysierter Hefesaft,
10,0 " $^m/_4$-Rohrzuckerlösung,
1,0 " Wasser,
0,5 " Toluol,
0,5 " Chloroform.

E. 20,0 ccm dialysierter Hefesaft,
10,0 " Wasser,
1,0 " m-Salzgemisch,
0,5 " Toluol,
0,5 " Chloroform.

Gemessene Menge Kohlensäure in ccm.

Zeit in Stunden	A	B	C	D	E
3,5	6,0	1,4	0,6	0	0
16	13,0	11,4	1,2	Spuren	Spuren
21	13,0	14,0	1,2	"	"

Versuch 2.

Ansatz von 3 Röhren A, B und C, die wie die Röhren A, C und E in Versuch 1 beschickt waren, jedoch unter Verwendung von dialysiertem Hefesaft aus Hefe K.

Gemessene Menge Kohlensäure in ccm.

Zeit in Stunden	A	B	C
14	3,0	Spur	Spur

Versuch 3.

Die Beschickung war folgende:

A. 20 ccm Wasser,
10 " $^m/_2$- Glucoselösung,
1 " m-Salzgemisch,
1 g ausgelaugte Acetontrockenhefe UM.

B. 20 ccm Wasser,
10 „ $^m/_2$-Fructoselösung,
1 „ m-Salzgemisch,
1 g ausgelaugte Acetontrockenhefe UM.

C. 21 ccm Wasser,
10 „ $^m/_2$-Glucoselösung,
1 g ausgelaugte Acetontrockenhefe UM.

D. 21 ccm Wasser,
10 „ $^m/_2$-Fructoselösung,
1 g ausgelaugte Acetontrockenhefe UM.

Gemessene Menge Kohlensäure in ccm.

Zeit in Stunden	A	B	C	D
6	3,1	3,3	0	0
52	5,5	5,0	0,6	0,6

Versuch 4.

Hier wurde ebenfalls durch Waschen koenzymfrei gemachte Acetontrockenhefe UM verwendet; das Material war jedoch zu anderer Zeit dargestellt und die Ansätze waren andersartig.

A. 10,0 ccm Wasser,
20,0 „ m-Traubenzuckerlösung,
2,0 „ m-Salzgemisch,
0,5 „ Toluol,
0,5 „ Chloroform,
2,0 g ausgelaugte Acetontrockenhefe UM.

B. 10,0 ccm Wasser,
20,0 „ $^m/_2$-Rohrzuckerlösung,
2,0 „ m-Salzgemisch,
0,5 „ Toluol,
0,5 „ Chloroform,
2,0 g ausgelaugte Acetontrockenhefe UM.

C. 12,0 ccm Wasser,
20,0 „ m-Traubenzuckerlösung,
0,5 „ Toluol,
0,5 „ Chloroform,
2,0 g ausgelaugte Acetontrockenhefe UM.

D. 12,0 ccm Wasser,
20,0 „ m/2-Rohrzuckerlösung,
0,5 „ Toluol,
0,5 „ Chloroform,
2,0 g ausgelaugte Acetontrockenhefe UM.

E. 30,0 ccm H_2O,
2,0 „ m-Salzgemisch,
0,5 „ Toluol,
0,5 „ Chloroform,
2,0 g ausgelaugte Acetontrockenhefe UM.

Gemessene Menge Kohlensäure in ccm.

Zeit in Stunden	A	B	C	D	E
4	0	0	0	0	0
25	2,1	3,2	0,5	1,4	Spur
48	4,0	5,2	1,5	2,3	0,5
73	5,7	6,0	1,55	2,8	1,5

Das Gemisch der Salze verschiedener α-Ketosäuren hat sich als befähigt erwiesen, „koenzymfreie“ Hefemacerationssäfte sowie „koenzymfreie“ Trockenhefe derart zu aktivieren, daß sie Traubenzucker, Fructose wie Rohrzucker, wenn auch in mäßigem Umfange, vergärten. Die Beziehungen der verwendeten α-Ketosäuren zu den Proteinbausteinen — den Aminosäuren — sprechen dafür, daß es sich hier um ein korrelatives Ineinandergreifen von Eiweiß- und Kohlenhydratstoffwechsel der Hefe handelt. Eine volle Koenzymwirkung ist von dem künstlichen Gemisch nicht zu erwarten, da ihm vielleicht gerade besonders wichtige Bestandteile des natürlichen Materials noch fehlen. Physikalische und chemische Eigenschaften von natürlichem Koenzym und seinem Ersatze würden in den Hauptpunkten übereinstimmen; völlige Identität besteht jedoch nicht.

Studien über Methylglyoxalbildung. II.

Von

Carl Neuberg und Bruno Rewald.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Die Bildung von Methylglyoxal aus den Zuckern der 6-Kohlenstoffreihe vollzieht sich nach früheren Versuchen von C. Neuberg und W. Oertel[1]) (siehe dort die Literatur) auch unter dem Einflusse von schwachem Alkali, wie Natriumcarbonat[2]), Natriumbicarbonat sowie Dinatriumphosphat. Inzwischen haben wir festgestellt, daß verdünntes Ammoniak ebenfalls ein sehr geeignetes Mittel zur Überführung der Zucker in Methylglyoxal darstellt. Bei gleichzeitiger Verwendung von Phenyl-

---

[1]) C. Neuberg und W. Oertel, diese Zeitschr. 55, 495, 1913.

[2]) Es ist sehr erstaunlich, daß jüngst die Herren A. Fernbach und M. Schön in Paris (Annales de l'Inst. Pasteur 28, 693, 1914) die Bildung von Methylglyoxalosazon aus mit Natriumcarbonat behandelter Glucose als neu beschreiben. Sie heben besonders die „gute" Ausbeute hervor, die sie auf 1,48 g Methylglyoxalosazon aus 12,5 g Traubenzucker beziffern. Demgegenüber sei darauf hingewiesen, daß wir ein Jahr früher (diese Zeitschr. 55, 497, 1913) aus 9 g Glucose 10 g Methylglyoxalosazon, allerdings Rohprodukt, isoliert haben und außerdem gerade die Reaktion mit Traubenzucker und Soda als Vorlesungsversuch zur Demonstration der schnellen Methylglyoxalbildung empfehlen konnten. Es muß zweifelhaft erscheinen, ob die französischen Autoren überhaupt Methylglyoxal in Händen gehabt haben, da sie ausdrücklich betonen, daß ihr Produkt in der Kälte Fehlingsche Lösung stark reduziert habe. Das tut bekanntlich Methylglyoxal nicht (Meisenheimer, Ber. 45, 2640, 1912). — In derselben Arbeit, in der Fernbach und Schön die Methylglyoxalbildung „auffinden", „entdecken" sie übrigens zugleich die Bedeutung der Brenztraubensäure für das Gärungsproblem! Auch eine Erklärung für die Entstehung von Acetylmethylcarbinol aus Aldol entlehnen sie unseren Arbeiten (s. C. Neuberg, Die Gärungsvorgänge. Monogr. Jena 1913).

hydrazin und Ammoniak gelingt es nicht nur, aus den früher untersuchten Zuckern Glucose, Mannose und Fructose Methylglyoxalosazon zu erhalten, sondern auch aus der Galaktose, dem Glucosamin, der Maltose, dem Milchzucker, der Arabinose, der Xylose und der Rhamnose[1]). Ferner beobachteten wir den Übergang des Dioxyacetons bei ammoniakalischer Reaktion in Methylglyoxal; bei saurer Lösung ist die analoge Umwandlung schon bekannt gewesen (G. Pinkus).

Wir geben in Fortführung unserer früheren Untersuchungen die experimentellen Daten an.

A. Pentosen.

a) l-Arabinose.

3 g Arabinose werden mit 150 ccm 10%igem Ammoniak und 5 g Phenylhydrazin 8 Stunden in einer Druckflasche in siedendem Wasserbade erhitzt. Nach völligem Erkalten wurde abfiltriert und das klare Filtrat noch einmal in der Druckflasche erwärmt, wobei noch ein zweiter geringer Niederschlag auftrat. Die Rückstände wurden vereinigt und im Vakuumexsikkator über konzentrierter Schwefelsäure vollkommen getrocknet. Die Rohausbeute betrug 4 g an einer dunklen, halb krystallinischen, halb schmierigen Masse. Dieselbe wurde kalt mit einer Mischung von 9 Teilen Benzol und 1 Teil Petroläther angerieben, wobei die Verunreinigungen in Lösung gingen und ein hellgelbes Krystallpulver zurückblieb. Dasselbe wurde abgesaugt und aus wenig siedendem Benzol umkrystallisiert. Unter Vernachlässigung der aus den Mutterlaugen noch krystallisierenden Anteile betrug die Ausbeute an Methylglyoxalosazon vom Schmelzpunkte[2]) 147° 0,9 g.

0,0902 g Substanz: 17,2 ccm N (15°, 753 mm).

$C_{15}H_{16}N_4$. Berechnet N = 22,22%; gefunden N = 22,02%.

---

[1]) Es sei daran erinnert, daß A. Windaus und F. Knoop (Ber. 38, 1106, 1905) aus ammoniakalischen Zuckerlösungen Methylimidazol erhielten und auf einen vorangehenden Zerfall in Methylglyoxal und Formaldehyd schlossen.

[2]) Durch wiederholtes Umkrystallisieren kann man den Schmelzpunkt des Methylglyoxalphenylosazons auf 153 bis 154° treiben, doch sinkt er leicht wieder bei Aufbewahrung der Substanz; vgl. J. U. Nef, Ann. 335, 247, 1904.

b) l-Xylose.

3 g l-Xylose lieferten bei der gleichen Behandlung 0,98 g reines Methylglyoxalosazon vom Schmelzpunkt 146°.

0,1307 g Substanz: 26,0 ccm N (18°, 746,5 mm).

$C_{15}H_{16}N_4$. Berechnet N = 22,22 %; gefunden N = 22,45 %.

B. Methylpentose.

3 g Rhamnose, 150 ccm 10 %iges Ammoniak und 5 g Phenylhydrazin lieferten 2 g sehr reines Rohprodukt, aus dem ohne weiteres 1,4 g analysenreines Methylglyoxalosazon vom Schmelzpunkt 145 bis 146° erhalten wurden.

0,0836 g Substanz: 16,2 ccm N (18°, 751 mm).

$C_{15}H_{16}N_4$. Berechnet N = 22,22 %; gefunden N = 22,00 %.

C. Hexosen.

a) d-Glucose.

6 g Traubenzucker wurden mit 300 ccm 10 %igem Ammoniak und 10,5 g Phenylhydrazin 12 Stunden lang in der Druckflasche auf 100° erhitzt. Nach dem Erkalten wurde abfiltriert und das Osazon, sehr wenig verschmiert, in gut ausgebildeten Krystallen erhalten. Das Filtrat lieferte bei erneuter Erwärmung noch eine zweite Krystallisation. Im ganzen wurden so aus zwei gleichen Ansätzen nach dem Trocknen über Schwefelsäure im Vakuum 8,5 g verhältnismäßig sauberes Methylglyoxalosazon erhalten. Durch Waschen mit Benzol und Umkrystallisation des Ungelösten wurden 2,6 g reine Substanz vom Schmelzpunkt 146° gewonnen. Die aus dem Waschbenzol sowie aus den Mutterlaugen sich noch abscheidenden Mengen wurden vernachlässigt.

0,0932 g Substanz: 18,1 ccm N (18°, 755,5 mm).

$C_{15}H_{16}N_4$. Berechnet N = 22,22 %; gefunden N = 22,20 %.

b) d-Fructose.

6 g Fruchtzucker wurden genau ebenso behandelt. Die Ausbeute ist hier bei der Ketose — ähnlich wie wir dies früher für die Behandlung mit Soda gefunden hatten — besser als bei der Aldose. Aus 6 g Fruchtzucker schieden sich 6,5 g Rohprodukt ab, aus dem ohne weiteres 2,5 g analysenreine Substanz vom Schmelzpunkt 146° gewonnen wurden.

0,1252 g Substanz : 24,4 ccm N (20°, 760 mm).

$C_{15}H_{16}N_4$. Berechnet N = 22,22 %; gefunden N = 22,20 %.

c) d-Galaktose.

In gleicher Weise wird aus Galaktose, Ammoniak[1]) und Phenylhydrazin das Methylglyoxalosazon gewonnen. Ausbeute 1,0 g Osazon aus 6 g Zucker; Schmelzpunkt 145°.

d) d-Glucosamin.

6 g Glucosaminchlorhydrat wurden mit 300 ccm 10 %igen Ammoniaks und 5 g Phenylhydrazin 8 Stunden lang in der Druckflasche erwärmt. Da sich beim Erkalten nur wenig Niederschlag ausschied, wurde ohne Filtration weitere 12 Stunden erhitzt. Das Reaktionsprodukt war stark verschmiert und haftete an den Wandungen der Flasche. Es konnte eine nahezu klare Flüssigkeit abgegossen und der Niederschlag in der Flasche abgespült werden. Die ganze Flasche wurde sodann im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet. Durch heißes Benzol wurde darauf das ganze Reaktionsprodukt aus der Druckflasche herausgelöst; beim Verdunsten hinterblieb ca. 3,6 g Rohprodukt. Durch Auslaugen mit kaltem und Umlösen aus heißem Benzol wurde daraus reines Osazon erhalten, das zur Trennung von braunen Beimengungen in diesem Fall unter Zusatz von Tierkohle umkrystallisiert werden mußte. Ausbeute 0,5 g, Schmelzpunkt 144°.

0,0672 g Substanz: 13,0 ccm N (16°, 756 mm).

$C_{15}H_{16}N_4$. Berechnet N = 22,22 %; gefunden N = 22,32 %.

---

[1]) Auch mit Natriumcarbonat läßt sich aus Galaktose, genau wie wir es früher für Fruchtzucker, Traubenzucker und Mannose beschrieben haben, Methylglyoxal als Osazon abscheiden. Z. B. wurden 9 g Galaktose mit 500 ccm Wasser, 14,5 g Krystallsoda und 16,5 ccm Phenylhydrazin 8 Stunden unter Rückfluß gekocht. Man dampft dann auf dem Wasserbade zur Hälfte ein und zieht das abgeschiedene und getrocknete Reaktionsprodukt mit kaltem Benzol aus. Es hinterbleibt ein Krystallkuchen, den man durch Auskneten mit einem Gemisch von $^9/_{10}$ Benzol und $^1/_{10}$ Ligroin von anhaftenden Verunreinigungen befreit und schließlich aus heißem Benzol umkrystallisiert. Erhalten wurden 2,8 g hellgelbe Krystalle vom Schmelzpunkt 145°.

0,0938 g Substanz : 18,2 ccm N (18°, 764 mm).

$C_{15}H_{16}N_4$. Berechnet N = 22,22 %; gefunden N = 22,52 %.

D. Disaccharide.

a) Maltose.

6 g Maltose wurden mit 300 ccm 10%igem Ammoniak und 20 g Phenylhydrazin 20 Stunden in der Druckflasche im siedenden Wasserbade erhitzt. Es entstand in reichlicher Menge ein dunkler Niederschlag, der abfiltriert und im Vakuum getrocknet wurde. Rohausbeute 6 g, die ohne Berücksichtigung der Mutterlaugen 1,7 g Analysensubstanz vom Schmelzpunkt 143° lieferten.

0,1078 g Substanz: 20,8 ccm N (18°, 756 mm).

$C_{15}H_{16}N_4$. Berechnet N = 22,22%; gefunden N = 22,06%.

b) Milchzucker.

Die gleiche Behandlung von 6 g Lactose ergaben 5,6 g Methylglyoxalosazon. Die Mutterlaugen wurden unter Zugabe von 2 ccm Phenylhydrazin noch einmal 8 Stunden lang in der Druckflasche erhitzt. Dabei wurden weitere 1,5 g erhalten. Die Gesamtausbeute der Rohsubstanz betrug also 7,1 g, die etwas mehr als 2 g analysenreine Verbindung vom Schmelzpunkt 144° lieferten.

0,0864 g Substanz: 16,6 ccm N (17°, 741 mm).

$C_{15}H_{16}N_4$. Berechnet N = 22,22%; gefunden N = 22,13%.

E. Triose.

a) 2 g Dioxyaceton wurden mit 100 ccm 10%igem Ammoniak und 6 ccm Phenylhydrazin in der Druckflasche erwärmt. Nach 5 Stunden hatte sich die beträchtliche Menge von 3,8 g Rohosazon ausgeschieden. Durch Erhitzen der Mutterlauge wurden noch 0,15 g erhalten. Das Osazon war fast frei von öligen Beimengungen. Seine besonders glatte und ergiebige Bildung ist bemerkenswert. Schmelzpunkt nach dem Umkrystallisieren 147 bis 148°.

0,1024 g Substanz: 19,6 ccm N (18°, 767 mm).

$C_{15}H_{16}N_4$. Berechnet N = 22,22%; gefunden N = 22,29%.

b) In ähnlicher Weise wie am Fruchtzucker[1]) läßt sich auch beim Dioxyaceton der schnelle Übergang in Methylglyoxal in einfacher Weise demonstrieren, und zwar auf genau dem gleichen Wege.

[1]) C. Neuberg und W. Oertel, diese Zeitschr. 55, 500, 1913.

Man löst 1,0 g Krystallsoda in einem Kolben in 25 ccm siedendem Wasser und gibt 1,0 ccm Phenylhydrazin sowie 0,5 g Dioxyaceton hinzu. Dabei tritt ohne weitere Wärmezufuhr fast augenblicklich Gelbfärbung und Abscheidung von Osazon ein; es fällt zunächst ölig aus, wird aber während des Erkaltens krystallinisch. Die Osazonmenge vermehrt sich noch beim Stehen, und nach 3 Stunden haben sich 0,9 g recht reines Rohosazon ausgeschieden, das durch zweimalige Umkrystallisation aus Benzol 0,45 g der reinen Verbindung vom Schmelzpunkt 148 bis 149^0 lieferte.

Auch diese mit Soda erhaltene Verbindung wurde analysiert.

0,0868 g Substanz: 16,4 ccm N (15^0, 752 mm).

$C_{15}H_{16}N_4$. Berechnet N = 22,22$^0/_0$; gefunden N = 21,82$^0/_0$.

Eine Bedeutung dieser Studien möchten wir in dem Nachweise erblicken, daß die Kohlenhydrate der verschiedensten Reihen in Methylglyoxal überzugehen imstande sind. Auch schwache Alkalien, wie Carbonat, Bicarbonat, Phosphat und Ammoniak, bringen diese Umwandlungen hervor.

Über Farbenreaktionen der Triosen und des Methylglyoxals.

Von

Carl Neuberg.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Bei den Forschungen über den Kohlenhydratabbau im pflanzlichen und tierischen Organismus spielen die Substanzen der 3-Kohlenstoffreihe eine besondere Rolle. Vornehmlich in Betracht kommen Brenztraubensäure, Methylglyoxal, Glycerinaldehyd und Dioxyaceton. Der Nachweis der Brenztraubensäure gelingt meist leicht. Viel schwieriger ist die Erkennung kleiner Mengen der Triosen und des Methylglyoxals.

Schon vor 14 Jahren habe ich einige Farbenreaktionen zum Nachweise von kleinen Mengen 3-Kohlenstoffzucker angegeben, die sich vielfach bewährt haben[1]. Da fortgesetzt ein Bedarf nach solchen Proben sich geltend macht, sind die früheren Untersuchungen jetzt erweitert worden; gleichzeitig wird über ihre Ausdehnung auf das Methylglyoxal und über die Nitroprussidreaktion dieser Körper berichtet. Eine einfache Beziehung zum Furfurol besteht nicht.

A. Farbenreaktionen des Glycerinaldehyds.

α) Orcinprobe des Glycerinaldehyds.

1. d,l-Glycerinaldehyd gibt, wie ich früher mitgeteilt habe, bei der üblichen Art der Anstellung[2] eine positive Reaktion. Zunächst entsteht ein weisses Kondensationsprodukt,

---

[1]) C. Neuberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 564, 1901.

[2]) Auch im folgenden sind die Reaktionen in der üblichen Weise (vgl. Neuberg, Der Harn, S. 336 bis 345) angestellt, sofern über Abweichungen nichts besonderes vermerkt ist.

das sich bei weiterem Erwärmen grün färbt und mit der gleichen Farbe von Amylalkohol aufgenommen wird.

2. Je nach Art des Erhitzens erhält man außer der früher beschriebenen grünen Nuance auch violette bis bräunliche Farbentöne. Sie weisen bei Aufnahme des Farbstoffes in Amylalkohol den typischen Streifen auf; er ist bis 30 Stunden beständig. Die veränderte Nuance erhält man namentlich bei mehrminutigem Kochen der verdünnten Glycerinaldehydlösung (1 %) und niedriger) mit den Reagenzien und bei nicht sofortiger Extraktion mit Amylalkohol.

3. Löst man ein Körnchen festen Glycerinaldehyds in 3 ccm Eisessig, gibt Orcin sowie 3 Tropfen rauchende Salzsäure hinzu, so entsteht anfangs eine rote Lösung, die dann einen dunkelbraunen Niederschlag absetzt. In der roten Lösung ist der Absorptionsstreifen, wenn auch nicht sehr kräftig, vorhanden.

β) Verhalten des Glycerinaldehyds zu Phloroglucin.

1. Mit Phloroglucin und Salzsäure gibt Glycerinaldehyd das bekannte weiße Kondensationsprodukt. Dieses wird beim längeren Erhitzen blaugrau bis braun. Weder der weiße noch der farbige Körper werden von Amylalkohol aufgenommen. Nur bei sehr langem Kochen und bei Anwendung abnorm großer Substanzmengen treten, wie schon früher angegeben, Spuren eines Reaktionsproduktes hinzu, dessen amylalkoholische Lösung einen ganz schwachen Streifen ungefähr an der typischen Stelle zeigt.

2. Nimmt man die Phloroglucinprobe in der Weise vor, daß ein Körnchen festen Glycerinaldehyds in 2,5 ccm Eisessig gelöst und mit Phloroglucin sowie 3 Tropfen Salzsäure (D = 1,18) erhitzt wird, so resultiert eine klare rotbraune Lösung, die unmittelbar einen Absorptionsstreifen im Grün besitzt.

Dieser Streifen, den man nach 24 Stunden noch ungeschwächt wahrnimmt, ist viel schwächer als bei einer ebenso angestellten Probe mit l-Arabinose; in letzterem Falle weicht auch die Nuance ab, die prächtig himbeerfarben ist.

γ) Verhalten des Glycerinaldehyds zu Resorcin.

1. Kocht man wie gewöhnlich mit 12 %iger Salzsäure 1 Minute lang, so erfolgt keine Färbung. Nach 3minutigem

Kochen tritt in der Flüssigkeit eine mäßige Trübung auf, die eine Gelbfärbung zugesetzten Amylalkohols, aber keinen Streifen und auch keine wesentliche Totalabsorption hervorbringt. (Bei Anwendung von rauchender HCl reagiert auch Glycerinaldehyd nach Art der Ketosen, ähnlich wie es auch Traubenzucker tut.)

2. Bei Anstellung der Probe mit festen Materialien in Eisessig unter Zugabe von 3 Tropfen konz. Salzsäure resultiert eine rötlich gelbe Flüssigkeit, die keinen Streifen, aber eine mäßig scharfe Totalabsorption im Grünblau aufweist.

Wie schon vor Jahren angegeben, tritt also mit Glycerinaldehyd die typische Resorcinprobe nicht ein.

δ) Verhalten des Glycerinaldehyds zu Nitroprussidnatrium.

Glycerinaldehydlösung gibt mit Nitroprussidnatrium und Lauge keine charakteristische Farbenreaktion. Diese bleibt auch bei Benutzung organischer Basen, wie Piperidin oder Diäthylamin, aus.

B. Farbenreaktionen des Dioxyacetons.

α) Die Orcinreaktion des Dioxyacetons.

Im Jahre 1901 hatte ich reines kristallisiertes Dioxyaceton nicht untersuchen können, sondern mußte mich mit „Glycerose“ begnügen.

Die Lücke ist jetzt ausgefüllt. Es ergab sich folgendes:

1. Erwärmt man eine 1 $^0/_0$ige wässerige Lösung von reinem Dioxyaceton mit einigen Körnchen festen Orcins und der gleichen Menge rauchender Salzsäure (je 2 bis 3 ccm), so tritt Grünfärbung ein. Schüttelt man jetzt, d. h. vor der Abscheidung eines weißblauen Niederschlags, mit Amylalkohol aus, so erhält man, unter völliger Entfärbung der wässerigen Schicht, einen grünen Auszug mit schwachem, aber typischem Orcinstreifen.

Bei etwa halbstündigem Stehen ändert der Amylalkoholauszug seine Farbe, sie wird olivbraun. Gleichzeitig schwächt sich der Streifen ab und ist am nächsten Tage verschwunden.

2. Dehnt man die Erwärmung der Dioxyacetonlösung mit Orcin und Salzsäure etwas länger aus, auf mindestens 3 Minuten, so kommt es zur Abscheidung eines grünlich-weißen

Niederschlags. Amylalkohol löst denselben unter Erzeugung eines schmutzig rotbraunen Auszugs. Derselbe zeigt eine Totalabsorption im Blau, aber keinen typischen Streifen. Am nächsten Tage ist die Färbung der Amylalkoholschicht tief dunkelbraun. Nach Verdünnung mit Amylalkohol ist nunmehr wieder ein schwacher Absorptionsstreifen im Gebiet zwischen C und D vorhanden.

3. Stellt man die Probe mit festem Dioxyaceton in Eisessig, einigen Körnchen Orcin und 3 Tropfen rauchender Salzsäure an, so erhält man eine prächtig blau-grüne Lösung. Sie ist völlig klar und zeigt den typischen Streifen. Sie verblaßt in etwa $^1/_4$ Stunde, und zu dieser Zeit, spätestens am nächsten Tage, ist auch der Absorptionsstreifen unter Braungelbfärbung der Amylalkoholschicht verschwunden.

β) Phloroglucinreaktion des Dioxyacetons.

1. 2,5 ccm $1\,^0/_0$ige Dioxyacetonlösung geben beim Erwärmen mit wenig festem Phloroglucin plus Salzsäure eine violettstichige Flüssigkeit, die unmittelbar einen Absorptionsstreifen im Gelb darbietet. Bei längerem Erwärmen kommt es zur Bildung eines Niederschlags, der sich in Amylalkohol rotbraun löst. Im Gelb ist wiederum ein Streifen vorhanden, der etwas mehr nach Rot liegt als das entsprechende Band bei l-Arabinose. Der Streifen ist noch nach 10 Stunden unverändert.

Die Ausschüttelung mit Amylalkohol muß geschehen, sobald der Niederschlag gerade ausfällt; denn sonst kommt es zur Bildung grober brauner Flocken, die nicht mehr in den Amylalkohol übergehen. Bei Verwendung von überschüssigem Phloroglucin tritt Kondensation zu einem weißgelben Produkt ein, dessen Lösung in Amylalkohol bräunlich ist und keinen Streifen darbietet.

2. Nimmt man die Probe mit den festen Materialien in Eisessig unter Zugabe von 3 Tropfen rauchender HCl vor, so entsteht eine schöne kirsch- bis blaurote Lösung, die nach Bedarf mit Eisessig zu verdünnen ist und dann ein starkes Band im Grün zeigt. (Bei entsprechender Anstellung der Probe mit Arabinose sind Nuance und Lage des Bandes ähnlich.) Nach 24 Stunden ist das Band in unveränderter Stärke vorhanden.

γ) Resorcinreaktion des Dioxyacetons.

1. Die Anstellung der Probe mit Dioxyacetonlösung unter Verwendung des gleichen Volumens 12%iger Salzsäure führt zu einem gelbroten Farbstoff, der von Amylalkohol mit granatroter bis himbeerfarbener Nuance aufgenommen wird und ein breites, etwas unscharfes Band im Grünblau erzeugt. Das Absorptionsband ist nach 24 Stunden unverändert.

Die Färbung des Amylalkohols ist sehr intensiv, auch wenn vor dem Ausschütteln die wässerig-salzsaure Flüssigkeit nur schwach rosa erscheint. Rauchende Salzsäure ergibt eine enorme Färbung.

2. Nimmt man die Reaktion mit einem Körnchen festem Dioxyaceton, festem Resorcin und 3 ccm konz. Salzsäure vor, so erhält man zunächst eine himbeerfarbene bis ziegelrote Lösung, dann einen ebensolchen Niederschlag. Er löst sich granatrot bis himbeerfarben in Amylalkohol und erteilt ihm das Absorptionsband im Blaugrün. Ist zu wenig Eisessig zugegen, so kommt es zur Bildung bläulich-roter Flocken, die sich ausscheiden und nachträglich in Eisessig und auch in Alkohol schwer löslich sind.

δ) Verhalten des Dioxyacetons zu Nitroprussidnatrium.

1. Man versetzt 2 ccm 1%ige Dioxyacetonlösung mit einigen Tropfen gesättigter Nitroprussidnatriumlösung und gibt dann Natronlauge hinzu. Man erhält eine Braun- bis Gelbrotfärbung, die auf Zugabe von Essigsäure im ersten Augenblick olivgrün, dann hellgrün (Ton etwa wie Methylgrün) wird.

2. Verwendet man an Stelle der Lauge Piperidin- oder Diäthylaminlösung, so wird das Gemisch ein wenig stärker gelb; ein Zusatz von Essigsäure bedingt die unspezifische grünstichige Bläuung.

C. Farbenreaktionen des Methylglyoxals.

α) Verhalten des Methylglyoxals zu Orcin.

1. Erwärmt man eine 1%ige Methylglyoxallösung mit etwas Orcin und der gleichen Menge rauchender Salzsäure, so entsteht ein gelbweißer Niederschlag. Seine Lösung in Amylalkohol ist gelblich und zeigt diffuse Allgemeinverdunklungen im Blau und Gelb, aber keinen Streifen.

2. Die Anstellung der Reaktion mit wasserfreiem Methylglyoxal in Eisessig führt zu einer bräunlichen Lösung, der nur eine Verdunklung des Blau, kein Absorptionsstreifen eigen ist.

β) Verhalten des Methylglyoxals zu Phloroglucin.

1. Die wie üblich angestellte Reaktion liefert einen kräftigen gelbweißen Niederschlag. Der Amylalkoholauszug ist bräunlich-gelb; ein Streifen ist nicht vorhanden, sondern nur eine diffuse Verdunklung des Blauvioletts.

2. Mit wasserfreiem Methylglyoxal in hinreichend Eisessig erhält man eine klare gelbbraune Lösung, die keinen Streifen aufweist, nur eine Absorption des äußersten Blau bedingt.

γ) Verhalten des Methylglyoxals zu Resorcin.

1. Bei der üblichen Art der Anstellung mit wässeriger Dioxyacetonlösung und Salzsäure von 12 $^0/_0$ tritt Gelbfärbung ein, die bei etwa 3 minutigem Kochen einen roten Stich annimmt. Der Amylalkoholauszug ist gelbrot, ohne scharfen Absorptionsstreifen; er zeigt eine breite Verdunklung des Grünblaus.

2. Erhöht man die Konzentration, indem man 0,15 g 100 $^0/_0$iges Methylglyoxal, festes Resorcin und 3 ccm 12 $^0/_0$ige Salzsäure verwendet, so entsteht eine Rotfärbung und später Trübung. Der Amylalkoholauszug ist rosarot und zeigt ein Band im Grün. Hat man länger, etwas über 3 Minuten, erhitzt, so wird der Amylalkoholauszug gelber und das Band schwächer.

δ) Nitroprussidreaktion des Methylglyoxals.

1. Versetzt man eine 1 $^0/_0$ige wässerige Lösung von Methylglyoxal mit Nitroprussidnatrium und Natronlauge, so färbt sich die Mischung tiefrot, auf Zusatz von Essigsäure violett (etwas bläulicher wie bei Anstellung der Probe mit Aceton).

2. Verwendet man bei gleicher Anstellung der Probe an Stelle von Natronlauge Diäthylamin- oder besser Piperidinlösung, so erfolgt eine Violettfärbung, die auf Zugabe von Essigsäure stahlblau wird.

3. Mit Methylglyoxalacetal erhält man bei Verwendung von Nitroprussidnatrium und Lauge, Diäthylamin oder

Piperidin sehr starke violettrote Töne, die mit Essigsäure in Violettblau umschlagen.

D. Zur Frage der Bildung von Furfurol aus den Triosen und Methylglyoxal.

Vor 14 Jahren habe ich zuerst darauf hingewiesen, daß die bis dahin übliche Bezeichnung der Farbenproben von Zuckern als Furfurolproben unzulässig ist, da sich Furfurol ganz anders verhält [1]).

Das ungleiche Verhalten der drei Substanzen Glycerinaldehyd, Dioxyaceton und Methylglyoxal lehrt ebenfalls, daß hier das Furfurol als Farbstoffbildner nicht in Betracht kommt.

Andererseits konnte ich zeigen [2]), daß die Fähigkeit zur Furfurolbildung eine weit verbreitete Eigenschaft ist, wenn sie auch im allgemeinen nur den polyhydroxylierten Substanzen der 5. und 6. Kohlenstoffreihe eigen ist. Da jedoch in den hier untersuchten 3-Kohlenstoffverbindungen Substanzen vorliegen, die zu den höheren Zuckerarten in Beziehung stehen, so ist die Möglichkeit eines Übergangs in Furfurol geprüft worden.

Tatsächlich gelingt es, beim trocknen Erhitzen von Glycerinaldehyd sowie von Dioxyaceton in einem langen schmalen Reagensglase Dämpfe zu entwickeln, die Anilinacetatpapier röten. Man muß aber größere Substanzmengen, etwa 2 g, für diese Versuche anwenden. Denn es entstehen massenhaft andere brenzliche Produkte, die kein Furfurol sind und mit essigsaurem Anilin braungelbe Farbentöne ergeben.

Die Reaktion ist ersichtlich von ganz anderer Größenordnung als etwa bei den Hexosen; offenbar tritt eine Kondensation zweier Triosenmolekel zum 6-Kohlenstoffzucker unter diesen Bedingungen nur in ganz geringem Umfange ein.

Auf keine Weise ist es gelungen, aus Methylglyoxal selbst Spuren von Furfurol zu erhalten; auch schnelle wie langsame trockene Erhitzung von Bimsteinstückchen oder Sand, die mit Methylglyoxallösung getränkt waren, führte nicht zum Ziele.

---

[1]) Vgl. hierzu Neuberg, Der Harn, S. 334.

[2]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 9, 555, 1908. Hier ist schon für Methylglyoxal ein negatives Ergebnis erzielt; jetzt ist reinstes Material mit demselben Resultat geprüft worden.

Der Übergang in Methylglyoxal und in die sich ebenso verhaltende Brenztraubensäure führt offenbar schon völlig aus der Zuckerreihe heraus.

Was nun die praktische Verwendbarkeit der behandelten Farbenreaktionen anlangt, so ergibt sich folgendes:

Bei der üblichen Anstellungsart der Farbenproben kann Glycerinaldehyd von Dioxyaceton dadurch unterschieden werden, daß nur letzteres eine positive Phloroglucinreaktion liefert. Beide Triosen geben eine positive Orcinprobe. Von den Pentosen und der Glucuronsäure ist der Glycerinaldehyd durch das Ausbleiben der Färbung mit Phloroglucin zu unterscheiden. Weiter reagiert das Dioxyaceton, nicht aber der Glycerinaldehyd, typisch mit Resorcin. Das Methylglyoxal verhält sich völlig anders [1]); es gibt weder eine Orcin- und Phloroglucin- noch eine ganz typische Resorcinprobe. Dagegen liefert es mit Nitroprussidnatrium und Lauge oder organischen Basen (sekundären Aminen) eine kräftige Rotfärbung, die durch Essigsäure violettblau wird. Mit Nitroprussidnatrium reagieren Glycerinaldehyd und Dioxyaceton ganz abweichend.

---

[1]) Die auch sonst wenig berechtigte Annahme von M. Oppenheimer (Zeitschr. f. physiol. Chem. 89, 66, 1914): „im Grunde genommen sind vielleicht alle Reaktionen des Methylglyoxals nichts anderes als solche des Glycerinaldehyds auch und umgekehrt“, findet durch das Experiment keine Stütze. Schon die groben Farbenproben beider Stoffe sind verschieden.

Einfache Umlagerungen in der Reihe der Glykole und ihrer stickstoffhaltigen Abkömmlinge.

II. Die Bildung von Propionaldehyd und Aceton aus Propylenglykol, Propylendiamin, Trimethylenglykol und Trimethylendiamin.

Von

Carl Neuberg und Bruno Rewald.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Vor kurzem haben wir über eine eigenartige Bildungsweise von Acetaldehyd aus Äthylenglykol und seinen stickstoffhaltigen Derivaten sowie seinen Carbonsäuren berichtet[1]. Es handelt sich bei dieser Reaktion um eine Entstehung der Gruppe $CH_3.CHO$ aus der Gruppe $CH_2OH.CH_2OH$, d. h. um die Verwirklichung eines Vorganges, der bei einer großen Reihe physiologischer Geschehnisse eine bedeutsame Rolle spielt. Wir durften die Analogie um so mehr hervorheben, als es gelang, die genannten Umwandlungen bei der Temperatur der lebenden Organismen zu verwirklichen,

Bereits in unserer ersten Mitteilung konnten wir darauf hinweisen, daß auch in den höheren Reihen der mehrwertigen Alkohole ein ähnlicher Reaktionsverlauf festzustellen ist; heute machen wir nähere Angaben über die Verhältnisse bei den Glykolen der Dreikohlenstoffreihe und deren Aminen, d. h. beim α-Propylenglykol, $CH_3.CHOH.CH_2OH$, beim Trimethylenglykol, $CH_2OH.CH_2.CH_2OH$, beim Propylendiamin, $CH_3.CHNH_2.CH_2NH_2$, und beim Trimethylendiamin, $CH_2NH_2.CH_2.CH_2.NH_2$.

---

[1] C. Neuberg und B. Rewald, diese Zeitschr. 67, 127, 1914.

Als umlagernde Agenzien benutzten wir — wie bei den Abkömmlingen des Äthylenglykols — salpetrige Säure und Wasserstoffsuperoxyd, erstere bei den Aminen der Glykole, letzteres bei den Alkoholen selbst.

Während in der Zweikohlenstoffreihe die Umlagerung nur zu einem einzigen Produkt, dem Acetaldehyd, führt, ist in der Dreikohlenstoffreihe ein Verlauf in doppelter Richtung möglich, d. h. die Überführung in Propionaldehyd, $CH_3.CH_2.CHO$, und in das isomere Aceton, $CH_3.CO.CH_3$.

Tatsächlich entstehen zumeist beide Produkte nebeneinander, und es ist möglich gewesen, beide zu fassen und zu charakterisieren. Es vollziehen sich also z. B. folgende Reaktionen:

$$\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{array} \begin{array}{l} \xrightarrow{H_2O_2} CH_3.CH_2.CHO \\ \\ \\ \\ \xrightarrow{H_2O_2} CH_3.CO.CH_3 \end{array} \qquad \begin{array}{l} CH_2.NH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CH_2.NH_2 \end{array} \begin{array}{l} \xrightarrow{HNO_2} CH_3.CH_2.CHO \\ \\ \\ \\ \xrightarrow{HNO_2} CH_3.CO.CH_3 \end{array}$$

Bisher war bei den Propandiolen nur durch gewaltsame Eingriffe[1]), wie Erhitzen auf hohe Temperaturen (250 bis 500°) oder Einwirkung heißer konzentrierter Schwefelsäure, eine Umwandlung in Aceton und Propionaldehyd zu erzielen. Wiederum ist es möglich gewesen, unsere Reaktionen bei Körpertemperatur auszuführen. Was die Erklärung der Vorgänge anlangt, so verweisen wir auf unsere früheren Ausführungen über die Erscheinungen in der Reihe des Äthylenglykols.

Experimenteller Teil.

In methodischer Hinsicht machen wir zu allen Versuchen als gemeinsame Vorbemerkung folgende Angaben: Die wahren Ausbeuten an den Reaktionsprodukten sind hier schwieriger zu ermitteln, da eine unmittelbare Bestimmung von Propionaldehyd und Aceton nicht ausführbar war. Dies ist nur für das Aceton möglich, das durch Behandlung mit Silberoxyd vom begleitenden Propionaldehyd abgetrennt wird. Hierbei wird der Aldehyd zur Propionsäure oxydiert, während das Aceton im

---

[1]) S. bei Victor Meyer-Jacobson 1. II. S. 85; Ch. C. **1904**, I. 1401.

wesentlichen unverändert bleibt[1]). Die Bestimmung der Propionsäure ist gleichfalls mit verschiedenen Schwierigkeiten verknüpft, da naturgemäß aus den Propandiolen neben dem einfachen Aceton und Propionaldehyd auch Oxyaldehyd und Oxyketone (Milchsäurealdehyd, Acetol, Methylglyoxal) entstehen. Die letztgenannten Körper liefern bei der Behandlung mit Silberoxyd z. T. flüchtige Essigsäure, die demnach der Propionsäure beigemischt ist. Nach dem Verfahren von E. Linnemann[2]) gelingt die Trennung, wenn auch nicht besonders glatt. Demnach stellen alle Angaben über die Ausbeuten Minimalwerte dar.

I. Überführung von α-Propylenglykol in Aceton und Propionaldehyd.

9 g α-Propylenglykol, $CH_3.CHOH.CH_2OH$, wurden mit 100 ccm Wasserstoffsuperoxyd von 3 %, 1 g Ferrosulfat sowie einigen Tropfen verdünnter Schwefelsäure (zur Lösung basischer Eisenverbindungen) versetzt und destilliert, bis in dem unter starker Eiskühlung aufgefangenen Destillat die Aldehydreaktionen ausblieben. Dann wurden durch einen Tropftrichter abermals 100 ccm Wasserstoffsuperoxyd hinzugegeben; im ganzen wurde diese Operation 15 mal wiederholt. Das erhaltene Destillat war sauer gegen Lackmus, aber nicht gegen Kongo. Es gab kräftig die Reaktion von Rimini, die bekanntlich mit dem Propionaldehyd positiv ausfällt, und reduzierte ammoniakalische Silberlösung sowie Fehlingsche Mischung; die Jodoformreaktion war überaus stark.

Das gesamte Destillat wurde noch einmal über Calciumcarbonat destilliert, wobei die ersten Tropfen deutlich „ölig" übergingen[3]). In zahlreichen Versuchen, auf diesem Wege zu einem Resultat zu kommen, fanden wir, daß beim Umkristallisieren des gelben p-Nitrophenylhydrazons stets ein roter Körper auftrat. Wir haben ihn aus mehreren Ansätzen gesammelt und als p-Nitrophenylosazon des Methylglyoxals erkannt. Dasselbe ist anfangs nur in kleinen Mengen vorhanden, bildet

[1]) Kleine Verluste an Aceton treten natürlich ein. Vgl. E. Friedmann, Beitr. z. chem. Physiol. u. Patholog. **11**, 202, 1908.

[2]) E. Linnemann, Annal. **160**, 223, 1871, vgl. auch K. R. Haberland, Zeitschr. f. anal. Chem. **38**, 217, 1899.

[3]) Bei Behandlung mit p-Nitrophenylhydrazin erhält man aus diesem Destillat ein zunächst rein gelbes Hydrazon, das trotz seines schönen Aussehens jedoch nicht einheitlich ist.

sich aber beim Umkrystallisieren der rohen Hydrazinverbindungen immer wieder; es hat demnach den Anschein, daß zunächst ein Hydrazon, etwa des Milchsäurealdehyds oder Acetols, vorliegt, das beim Umkrystallisieren den anderen Verbindungen Hydrazinbase entzieht und dabei das erwähnte Methylglyoxalosazon liefert.

Von der gesamten mit Calciumcarbonat gekochten Flüssigkeit wurden 500 ccm abdestilliert; sie reagierten nur noch schwach sauer. Ungesättigte Verbindungen[1]) waren nicht zugegen, wenigstens wurde Bromwasser nicht entfärbt. Das Destillat wurde alsdann 3 Stunden lang mit Silberoxyd, das frisch aus 45 g Silbernitrat bereitet war, an einem sehr gut wirkenden Energiekühler zum Sieden erhitzt. Nunmehr wurden 50 ccm von der silberhaltigen Flüssigkeit abdestilliert. Dieses Destillat gab keine Reaktionen auf Aldehyd mehr, dagegen sämtliche Proben des Acetons (Reaktion von Legal, Jodoformreaktion, Bromnitrosopropanreaktion) in intensivster Weise.

Mit essigsaurem p-Nitrophenylhydrazin erstarrte die Flüssigkeit augenblicklich zu einem gelben Krystallbrei. Der Schmelzpunkt des Rohhydrazons lag bei 142°[2]) und stieg durch einmaliges Umkrystallisieren aus 20%igem Alkohol auf 149°. Für die reine Acetonverbindung wird gleichfalls der Schmelzpunkt 149° angegeben. Die Ausbeute an isoliertem Aceton-p-nitrophenylhydrazon betrug 3,2 g.

0,0653 g Substanz gaben 12,6 ccm N (19°, 751 mm).

$C_9H_{11}N_3O_2$: berechnet N = 21,75%; gef. N = 21,80%.

Der Destillationsrückstand, der unverändertes Silberoxyd, durch Reduktion entstandenes metallisches Silber sowie Silbersalze enthielt, wurde mit 20%iger Schwefelsäure deutlich kongosauer gemacht und in strömendem Dampf destilliert, solange noch eine saure Flüssigkeit überging. Im ganzen wurden rund 6 l Destillat aufgefangen. Dasselbe wurde nach Linnemann direkt mit reinem Bleioxyd versetzt und auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft, wobei die Reaktion stark alkalisch wurde. Der Rückstand wurde gepulvert und mit 250 ccm Wasser von 40° angerieben und 14 Stunden bei 40° belassen. Als-

[1]) Vgl. Seite 165.

[2]) Propionaldehyd-p-nitrophenylhydrazon schmilzt nach E. Erdmann, F. Bedford u. F. Raspe (Ber. 42, 1342, 1909) bei 124 bis 124,5°.

dann wurde filtriert und eingeengt, bis die ersten größeren Ausscheidungen eines weißen Bleisalzes auftraten. Dann wurde filtriert und das Filtrat zum Sieden erhitzt oder wieder bis zum Eintritte deutlicher Krystallisation eingedampft und so fort. Im ganzen wurden vier Krystallisationen abgeschieden. Die ersten zwei Portionen Bleisalz wurden in Wasser aufgeschwemmt und durch vorsichtigen Zusatz von verdünnter Schwefelsäure von Blei befreit. Zur Vervollständigung der Bleisulfatausfällung wurde das gleiche Volumen Alkohol hinzugegeben und das Gemisch 24 Stunden lang aufbewahrt. Nach dieser Zeit wurde filtriert, ausgewaschen und mit heißem Barytwasser alkalisch gemacht. Nach dem Eindampfen, wobei der Alkohol entwich, wurde durch Einleiten von Kohlensäure der überschüssige Baryt gefällt und das Filtrat von Bariumcarbonat zur Trockne verdampft. Das erhaltene Barytsalz wurde in Wasser gelöst, filtriert, mit einigen Tropfen Salpetersäure gerade neutralisiert und mit 60%igem Silbernitrat ausgefällt. Es entstand ein rein weißer, dicker Krystallbrei, der abgesaugt und nacheinander mit Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen wurde. Die Ausbeute betrug 1,25 g. Nach der Analyse lag propionsaures Silber in großer Reinheit vor.

0,1381 g Silbersalz ergaben 0,0824 g Ag.

$CH_3.CH_2.COOAg$: berechnet Ag = 59,66%; gef. Ag = 59,60%.

II. Überführung des Propylendiamins in Aceton und Propionaldehyd.

Zu den mit 130 ccm $^n/_{10}$-Salzsäure (kleiner Überschuß) neutralisierten 5 g Base, $CH_3.CHNH_2.CH_2NH_2$, die sich in einem Destillationskolben befanden, wurde eine Lösung von 3,8 g Natriumnitrit in 50 ccm Wasser tropfen gelassen. Es tritt eine heftige Reaktion ein, bei der unter Stickstoffentwickelung die Reaktionsprodukte entweichen und in einer eisgekühlten Vorlage nach Kondensation im Kühler aufgefangen werden. Sobald 100 ccm abdestilliert sind, wird die Aldehydreaktion schwach. Es werden dann noch 3 g Nitrit in 30 ccm Wasser sehr allmählich hinzugesetzt, und gleichzeitig wird weiterdestilliert. Das Übergegangene wurde direkt mit 20 g Silberoxyd am Rückflußkühler 2 Stunden lang gekocht. Alsdann wurden 50 ccm übergetrieben, die äußerst stark sämtliche Reaktionen des Acetons

gaben, aber keinen Aldehyd mehr enthielten. Das Destillat wurde auf 150 ccm aufgefüllt; 50 ccm dienten zur Darstellung des p-Nitrophenylhydrazons. Dasselbe fiel sofort als rein gelbes Magma aus. Der Schmelzpunkt des Rohproduktes lag bei 144°; er stieg durch einmaliges Umkrystallisieren aus 20%igem Alkohol auf 148 bis 149°. An diesem Hydrazon wurden 1,5 g, im ganzen also 4,5 g erhalten.

0,1034 g Substanz lieferten 19,8 ccm N bei 17° und 750 mm.

$C_9H_{11}N_3O_2$. Berechnet N = 21,75%; gefunden 21,72%.

Diese Daten lehren, daß als Hauptprodukt der Reaktion Aceton auftrat.

Die Verarbeitung der bei der Silberoxydbehandlung restierenden Silbersalze geschah genau wie sub I über das Blei-, Barium- und Silbersalz. Es resultierte schließlich jedoch nur eine geringe Quantität eines Salzes, das als Silberpropionat gelten kann. Die Analyse stimmte nicht ganz scharf, so daß es zweifelhaft bleiben muß, ob hier wirklich wesentliche Mengen von Propionaldehyd gebildet worden sind.

III. Überführung des Trimethylenglykols in Propionaldehyd.

6 g Trimethylenglykol wurden unter Zugabe von 0,25 g $FeSO_4$ und einigen Tropfen verdünnter H_2SO_4 in 100 ccm 3%igem Hydroperoxyd gelöst und unter guter Kühlung destilliert, wie S. 160 beschrieben ist. Der Zusatz von je 100 ccm Wasserstoffsuperoxyd wurde 5 mal wiederholt. Das Destillat roch stark nach Acroleïn, gab kräftige Reaktion nach Rimini und Legal und reduzierte Fehlingsche Mischung, wenn auch schwach.

Das gesamte Destillat wurde am Energie-Rückflußkühler $1^1/_2$ Stunden mit dem aus 25 g festem $AgNO_3$ erhaltenen Silberoxyd gekocht.

Von den Silbersalzen wurden 50 ccm Flüssigkeit abdestilliert. Sie gab eine schwache Legalsche Probe. p-Nitrophenylhydrazinacetat schlug eine geringe Menge gelbroter Krystalle nieder. Nach zweimaligem Umkrystallisieren blieb nur noch Material zur Bestimmung des Schmelzpunktes, der gegen 147° lag.

Das im Destillationskolben hinterbliebene Gemisch der Silberverbindungen wurde mit H_2SO_4 kongosauer gemacht und

mit Wasserdampf behandelt, bis nichts Saures mehr überging. Das Destillat (5 l) wurde mit überschüssigem Bleioxyd eingedampft und nach den Angaben auf S. 162 verarbeitet. Durch Überführung des unlöslichen Bleisalzes in die Barytverbindung und deren Umsetzung mit 60%igem Silbernitrat wurden 1,2 g Silbersalz erhalten, das nach der Analyse das Propionat war.

0,3024 g Silbersalz ergaben 0,1814 g Ag.

$CH_3.CH_2.COOAg$: Berechnet Ag = 59,66%; gefunden Ag = 59,96%.

Acrylat war als Beimengung nicht vorhanden; nach den Angaben von Linnemann läßt sich Acrylsäure durch die angewandte Bleimethode von der Propionsäure trennen.

IV. Überführung von Trimethylendiamin in Aceton und Propionaldehyd.

6 g Trimethylendiamin, $CH_2NH_2.CH_2.CH_2NH_2$, wurden mit 120 ccm n-HCl neutralisiert. Die Lösung des Chlorhydrats wurde alsdann durch einen Tropftrichter in die siedende Lösung von 12 g Natriumnitrit in 120 ccm Wasser eingetropft. Unter Entwickelung von Stickstoff entwichen die Reaktionsprodukte, die durch einen absteigenden Kühler in eine geeiste Vorlage übergeleitet wurden. Die Destillation wurde unter Ersatz des verdampften Wassers (100 ccm) fortgesetzt, solange im Übergegangenen die Aldehydreaktionen noch positiv ausfielen. Merkwürdigerweise reagierte das Destillat alkalisch (siehe unten). Es wurde deshalb mit Schwefelsäure neutralisiert und abermals destilliert. Die sub I beschriebenen Erfahrungen bezüglich des p-Nitrophenylhydrazons wurden auch hier gemacht, so daß die Trennung der Reaktionsprodukte wiederum nach dem Silberoxydverfahren ausgeführt wurden. Nach 2stündiger Behandlung mit dem aus 30 g $AgNO_3$ erhaltenen Ag_2O wurden 30 ccm unter guter Kühlung abgetrieben.

Dieses Destillat roch direkt nach Aceton, zugleich aber ausgesprochen nach Allylalkohol. Der Gehalt an diesem verriet sich durch die Fähigkeit der Flüssigkeit, Bromwasser augenblicklich zu entfärben. Gleichzeitig lehrt die vorerwähnte Abgabe eines flüchtigen Alkali, das sich als Ammoniak erwies, daß

die Reaktion zum Teil im Sinne folgender Gleichung verläuft[1]).

$$\begin{array}{l} CH_2NH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CH_2NH_2 \end{array} + HNO_2 = NH_3 + 2N + H_2O + \begin{array}{l} CH_2 \\ \| \\ CH \\ | \\ CH_2OH \end{array}$$

Eine Beimengung von Allylalkohol störte jedoch den Nachweis und die Isolierung des Acetons nicht. Die Reaktion mit Nitroprussidnatrium sowie die beweisende Hydroxylamin-Bromwasserprobe fielen kräftig positiv aus, und auf Zusatz einer konzentrierten Lösung von essigsaurem p-Nitrophenylhydrazin entstand sofort ein dicker gelber Brei von Krystallen. Nach dem Absaugen und Auswaschen mit etwas kaltem Wasser besaßen dieselben sofort den richtigen Schmelzpunkt des Aceton-p-nitrophenylhydrazons, 145°. Die Menge der isolierten Verbindung betrug 1,6 g.

0,0793 g Substanz gaben 15,4 ccm bei 19° und 746 mm.

$C_9H_{11}N_3O_2$. Berechnet N = 21,75; gefunden N = 21,82%.

Der Destillationsrückstand, in dem sich unter anderem die durch Aldehydoxydation entstandene Propionsäure finden mußte, wurde mit Phosphorsäure angesäuert und im Dampfstrom destilliert. Es gingen $4^1/_2$ l sauer reagierende Flüssigkeit über. Dieselben wurden alsdann nach dem Verfahren von Linnemann in der zuvor beschriebenen Ausführungsform mit Bleioxyd behandelt. Das schließlich erhaltene Silbersalz (0,4 g) erwies sich auch hier als Silberpropionat.

0,0908 g Silbersalz ergaben 0,0540 g Silber.

$CH_3.CH_2.COOAg$: Berechnet Ag = 59,66%; gefunden Ag = 59,74%.

V. und VI. Umwandlung von Propylenglykol und Propylendiamin bei 40°.

V. 8 g α-Propylenglykol wurden in 300 ccm Wasserstoffsuperoxyd von 3% unter Zugabe von 1 g Eisensulfat gelöst

[1]) Die Entstehung ungesättigter Alkohole aus Pentamethylendiamin haben vor Jahren Demjanow und Dojarenko beobachtet (Ber. **40**, 2589, 1907). Auch Allylamin wäre als Zwischenprodukt denkbar, da es nach L. Henry (Chem. Centralbl. **1908**, I, 615) mit Nitrit in normaler Reaktion Allylalkohol liefert. Derselbe entsteht auch nach N. Kishner Chem. Centralbl. **1905**, I, 1704) durch Diazotierung von Aminocyclopropan.

und im Rückflußkühler 3 Tage lang bei 40° gehalten. Von dem Reaktionsgemisch wurden im Vakuum bei 25° Badtemperatur etwa 50 ccm übergetrieben. Dieselben gaben deutlich die Legalsche Probe und die Bromnitrosopropanreaktion auf Aceton.

VI. 2 g Propylendiamin wurden mit 60 ccm n-Salzsäure neutralisiert und mit 2 g Nitrit in 20 ccm Wasser versetzt. Das Gefäß mit dieser Mischung wurde sodann auf 40° erwärmt und durch dasselbe bei dieser Temperatur ein Luftstrom gesaugt, der eine gekühlte und mit 5 ccm Wasser beschickte Vorlage durchstrich. Im ganzen wurde 2 mal je 12 Stunden Luft hindurchgesaugt. Die Flüssigkeit in der Vorlage gab sodann schwach die Acetonreaktionen. Sie wurde sodann im Vakuum bei 25° unter stärkster Kühlung abdestilliert; es ging eine Flüssigkeit über, die viel deutlicher einen Gehalt an Aceton erkennen ließ.

Zur Methodik der Bestimmung von Milchsäure neben Brenztraubensäure.

Von

Ludwig Czapski.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 21. Juli 1914.)

Bei experimentellen Untersuchungen über das Verhalten intermediärer Zuckerabbauprodukte im Stoffwechsel und im Durchblutungsversuche ist man öfter vor die Aufgabe gestellt, Milchsäure und Brenztraubensäure zu trennen.

Für diesen Zweck haben G. Embden und M. Oppenheimer[1]) folgendes Verfahren angegeben:

„Der mit krystallwasserfreiem Natriumsulfat getrocknete und filtrierte Ätherextrakt wurde nach dem Abdestillieren des Äthers und unter dem üblichen Zusatz von ca. 40 ccm Wasser, mit 40 ccm 20%iger Natriumbisulfitlösung versetzt und nach etwa einstündigem Stehen unter entsprechender Verdünnung und nach Zusatz von 90 g Ammonsulfat weitere 40 Stunden mit Äther extrahiert."

Der ätherische Auszug dient dann nach dem Verdampfen des Äthers usw. zur Bestimmung der Milchsäure.

Dies Verfahren hat zur Voraussetzung, daß aus einer mit Bisulfit versetzten Lösung von Brenztraubensäure diese auch bei erschöpfender Extraktion nicht in den Äther übergeht. Diese Annahme trifft nun nicht ohne weiteres zu.

Läßt man eine Lösung von 3 g Brenztraubensäure in 20 ccm H_2O unter Zusatz von 20 ccm 20%iger Bisulfitlösung[2]) eine Stunde stehen und extrahiert darauf nach Zugabe von 40 ccm H_2O und 45 g Ammonsulfat (d. h. etwa unter den von E. und

[1]) Diese Zeitschr. 55, 340, 1913.

[2]) d. i. etwas mehr als die theoretisch erforderliche Menge.

O. innegehaltenen Bedingungen) im Perkolator nur $4^1/_2$ Stunden, so erhält man schon aus dem mit Wasser versetzten und vom Äther befreiten Auszuge deutliche positive Reaktionen auf Brenztraubensäure mit Nitroprussidnatrium sowie mit essigsaurem p-Nitrophenylhydrazin und gewöhnlichem Phenylhydrazin. In einem gleichen Versuch erhielt ich nach 38stündiger Extraktion aus dem Ätherauszug so viel Hydrazon, daß bequem der Schmelzpunkt bestimmt werden konnte.

Erhöhte man aber die Menge des Bisulfits auf das Doppelte, so trat bei 40stündiger Extraktion keine Brenztraubensäure in den Äther über.

Als praktische Regel empfiehlt sich daher, die Menge des Bisulfits so hoch zu bemessen, daß es mindestens ausreicht, das Doppelte der zu erwartenden Quantität Brenztraubensäure zu binden.

Bei dieser Gelegenheit möchte ich darauf aufmerksam machen, daß das Zinksalz der Brenztraubensäure sehr leicht krystallisiert und sich unter ähnlichen Bedingungen wie Zinklactat abscheidet. Das Zinkpyruvinat hat die Zusammensetzung $(C_3H_3O_3)_2 Zn + 3 H_2O$ und weicht demnach nur unerheblich, durch ein Minus im H-Gehalt, von der Zusammensetzung des racemischen Zinklactats $(C_3H_5O_3)_2 Zn + 3 H_2O$ (und des durch Alkohol aus wässeriger Lösung ausgefällten aktiven Zinklactats) ab. Daher ist in den Fällen, wo eine Kontrolle durch optische Untersuchung der Milchsäure fortfällt, eine Verwechslung beider Zinksalze möglich. Man kann ein Vorliegen von Pyruvinat auch im Zinksalz mit der Nitroprussidnatrium-Reaktion erkennen, allerdings schlecht direkt; man zerlegt zweckmäßig mit Natriumcarbonatlösung und benutzt das klare Filtrat vom kohlensauren Zink in gewohnter Weise.

Über die Oxydation von Aminen.

Von

K. Suto.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie zu Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 26. Juli 1914.)

Durch die Forschungen der letzten Jahre haben die sogenannten proteinogenen Amine eine besondere Bedeutung erlangt. Unter proteinogenen Aminen versteht man solche Basen, die aus den Eiweißkörpern bzw. ihren Bausteinen, den Aminosäuren, durch Loslösung von Kohlensäure hervorgehen. Unsere Kenntnis von der Bildung basischer Substanzen aus Aminosäuren ist durch Arbeiten von Nencki, Ellinger, Neuberg und neuerdings von Ehrlich, Barger und Dale sowie von Sasaki erweitert worden. Die Bedeutung dieser Verbindungen ist darin gelegen, daß sie im Gegensatz zu ihren Muttersubstanzen, den Aminosäuren, physiologisch nicht indifferent, sondern im Gegenteil von ausgesprochener Wirksamkeit sind. Die Bildung der Amine aus den Aminosäuren vollzieht sich wohl in erster Linie durch bakterielle Prozesse, aber auch Stoffwechselvorgänge könnten an ihrer Entstehung mitwirken.

Es erhebt sich nun die Frage, wie kann der Organismus diese Substanzen bewältigen, wenn sie in den Kreislauf gelangen? Das Schicksal und die Umwandlungen von Aminen im tierischen Organismus sind wenig bekannt, und auch in rein chemischer Hinsicht liegen nur spärliche Angaben über die oxydativen Umwandlungen dieser Basen vor.

Durch Abtrennung der Aminogruppe gehen nun aus den Aminen Substanzen hervor, deren Verhalten im Organismus weit besser bekannt ist. Ich habe daher auf Veranlassung von

Prof. C. Neuberg versucht, eine einfache Möglichkeit der desaminierenden Oxydation von Aminen ausfindig zu machen.

Als ein Oxydationsmittel, das Ähnlichkeit mit den physiologischen Agenzien besitzt[1]), gilt das Gemisch von Hydroperoxyd und Eisensalz; seine Wirkung auf die Amine ist bisher nicht studiert worden. Es zeigte sich, daß die Amine, am besten in Form ihrer Sulfate, von 3$^0/_0$ Wasserstoffsuperoxyd bei Anwesenheit von Ferrosulfat angegriffen und dabei unter Loslösung von Ammoniak in die entsprechenden Aldehyde mit der gleichen Kohlenstoffanzahl umgewandelt werden. Vier verschiedene Amine habe ich nach dieser Richtung untersucht, und zwar das Äthylamin, das Isoamylamin, das Benzylamin und den Aminoäthylalkohol. Es entstehen bei ihrer Oxydation Acetaldehyd, Isovaleraldehyd, Benzaldehyd und Glykolaldehyd bzw. Glyoxal.

Die Oxydation des Aminoäthylalkohols wird zweckmäßig bei mittlerer Temperatur vorgenommen, bei den anderen Verbindungen ist die Anwendung einer erhöhten Temperatur notwendig, weil die Reaktion in der Kälte nur äußerst träge verläuft.

Die gebildeten Aldehyde, die man, soweit sie flüchtig sind, abdestillieren kann, sind leicht durch die üblichen Reagenzien nachzuweisen; sie wurden durch Fällung mit Phenylhydrazin oder mit einem Substitutionsprodukt desselben zur Abscheidung gebracht. Die Einzelheiten, die aus dem experimentellen Teile hervorgehen, lehren, daß die Amine in der erwähnten Weise angreifbar und zu Substanzen oxydierbar sind, deren Bewältigung für den Organismus keine ungewohnte Leistung darstellen dürfte. Denn ich möchte hervorheben, daß die oxydativen Umwandlungen der Amine in Aldehyde weitgehend dem bekannten Abbau der Aminosäuren[2]) durch Wasserstoffsuperoxyd und Eisensalz entsprechen. Allem Anschein nach werden jedoch die Aminosäuren leichter angegriffen als die durch Decarboxylation daraus sich ableitenden Amine.

---

[1]) Vgl. C. Neuberg und F. Blumenthal, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 2, 243, 1902.

[2]) C. Neuberg u. F. Blumenthal, Deutsche med. Wochenschr. 1901, 1; Beiträge z. chem. Phys. u. Pathol. 2, 238, 1902; C. Neuberg, diese Zeitschr. 20, 531, 1909. H. D. Dakin, Journ. of Biol. Chem. 1, 171, 1906; 4, 63, 1908.

Experimentelles.

1.

9,5 g Äthylaminsulfat wurden mit 110 ccm 3 °/₀ igen Wasserstoffsuperoxyd und etwa 0,1 g Ferrosulfat versetzt. Beim Aufbewahren in der Kälte zeigte die Mischung noch nach 5 Tagen einen Gehalt an unverbrauchtem Wasserstoffsuperoxyd. Zur Beschleunigung der Reaktion wurde das Gemisch nunmehr aus einem Destillierkolben unter Zwischenschaltung eines Energiekühlers in eine von Eis umgebene Vorlage destilliert. Nachdem 50 ccm übergetrieben waren, wurden abermals 50 ccm Wasserstoffsuperoxyd und einige Tropfen konzentrierte Ferrosulfatlösung durch einen Tropftrichter in das Destillationsgefäß gebracht und wiederum destilliert. Das Destillat zeigte eine deutliche Reaktion auf Acetaldehyd mit Nitroprussidnatrium und Piperidin. Die Destillation mit Wasserstoffsuperoxyd und Eisensalz[1]) wurde so oft wiederholt, bis das Destillat keine Reaktion auf Aldehyd mehr gab. Die Gesamtmenge des Übergegangenen belief sich auf 500 ccm, die durch erneute Destillation unter Eiskühlung auf 170 ccm gebracht wurden. Auf Zusatz einer klar filtrierten Lösung von essigsaurem p-Nitrophenylhydrazin schied sich ein eigelber Niederschlag ab, der nach kurzem Stehen im Eisschrank abgenutscht und im Exsiccator getrocknet wurde. Die Ausbeute an diesem Produkt betrug 0,98 g. Es schmolz zunächst bei 114°, nach dem Umkrystallisieren jedoch bei 127 bis 128°. Die Analyse zeigte, daß reines Acetaldehyd p-nitrophenylhydrazon vorlag.

0,2290 g lieferten 49,9 ccm N (bei 746 mm und 30°).

$C_8H_9N_3O_2$. Ber.: N = 23,47 °/₀; gef.: N = 23,21 °/₀.

2.

5,6 g wasserfreies Amylamin wurden in 60 ccm n-Schwefelsäure gelöst und mit 110 ccm Wasserstoffsuperoxyd sowie 0,1 g Ferrosulfat versetzt.

Da beim Stehen in der Kälte die Oxydation nur langsam fortschritt, wurde sie, genau wie beim Äthylaminsulfat, in der Wärme vorgenommen. Die Destillation mit jedesmaliger Nach-

[1]) Sobald Trübung durch basisches Eisensalz eintrat, wurden einige Tropfen verd. H_2SO_4 mit hinzugegeben.

füllung von 110 ccm 3 %igem Hydroperoxyd wurde fortgesetzt, bis das Destillat mit fuchsinschwefliger Säure keine rosa Färbung mehr ergab. Es wurden im ganzen 1100 ccm Wasserstoffsuperoxyd verbraucht.

Das Destillat, das deutlich nach Valeraldehyd roch, wurde durch Destillation erst auf 600 ccm und dann durch nochmalige Destillation auf 335 ccm gebracht.

Der Gehalt an Aldehyd wurde an einem gemessenen Teil mit der Bisulfitmethode nach Ripper-v. Fürth bestimmt; er ergab sich zu 0,94 g.

250 ccm des Destillats wurden zur Darstellung des p-Nitrophenylhydrazons benützt, das in gelbroten Nadeln ausfiel. Durch zweimalige Umkrystallisation aus verdünntem Alkohol erhielt ich daraus die reine Verbindung in einer Ausbeute von 0,59 g. Die Analyse der bei 110° bis 111° schmelzenden Verbindung ergab folgendes:

0,1406 g Substanz lieferten 23,9 ccm N (758 mm, 22°).

$C_{11}H_{15}N_3O_2$. Ber.: N = 19,00 %; gef.: N = 19,21 %.

3.

3 ccm reiner Aminoäthylalkohol wurden in 50 ccm n-Schwefelsäure gelöst und mit 60 ccm 3 %igem Wasserstoffsuperoxyd versetzt. Dazu wurde ein Krystall von festem Ferrosulfat gegeben. Nach 3 tägigem Stehen in der Kälte enthielt die Flüssigkeit noch ein wenig Wasserstoffsuperoxyd. Sie wurde deshalb kurze Zeit auf etwa 30° und schließlich auf 50° erhitzt. Nunmehr war das Wasserstoffsuperoxyd verbraucht, und die Lösung reduzierte stark die Fehlingsche Mischung.

Nach Zusatz von essigsaurem Phenylhydrazin wurde das Reaktionsprodukt 2 Stunden im siedenden Wasserbade erhitzt, wobei eine beträchtliche Ausscheidung gelblicher Krystalle eintrat. Dieselben wurden abgesaugt und 2 mal in kaltem Wasser ausgewaschen. Das Filtrat ergab bei erneutem Erwärmen nochmals eine Ausscheidung von Osazon, das ebenso behandelt wurde. Die vereinigten Niederschläge wurden aus verdünntem Alkohol unter Zusatz von wenig Knochenkohle und dann aus verdünntem Alkohol allein umkrystallisiert. Das Osazon war zunächst gelbrot gefärbt und schmolz bei 159°. Durch Krystallisation aus Äther stieg der Schmelzpunkt bis auf 167°

und erreichte bei nochmaliger Umlösung aus Äther 174° (bei schnellem Erhitzen). Die Substanz war jetzt blaßgelb und besaß alle Eigenschaften des bekannten Glyoxalphenylosazons. Es wurden 0,32 g von dem Osazon erhalten.

0,1354 g Substanz lieferten 28,4 ccm Stickstoff (755 mm und 28°).

$C_{14}H_{14}N_4$. Ber.: N = 23,53%; gef.: N = 23,69%.

4.

10,7 g Benzylamin wurden mit 100 ccm n-H_2SO_4 in Lösung gebracht und mit 1 g Ferrosulfat, sowie mit 120 ccm 3%igem Wasserstoffsuperoxyd versetzt. Die Destillation wurde in der zuvor beschriebenen Weise ausgeführt. Es ging eine durch Öltropfen getrübte Flüssigkeit über. Im ganzen wurden 600 ccm Hydroperoxydlösung angewendet, die in Portionen zu 120 ccm mit jeweils einem Tropfen verd. Schwefelsäure und einer Spur $FeSO_4$ zugegeben wurden.

Die vereinigten Destillate, die deutlich nach Benzaldehyd rochen, wurden 3 mal mit Äther ausgeschüttelt. Die über wasserfreiem Natriumsulfat getrockneten Ätherextrakte wurden auf dem Wasserbade am Birektifikator abdestilliert und das hinterbliebene Öl mit einer Lösung von essigsaurem Phenylhydrazin versetzt.

Das alsbald ausgeschiedene Hydrazon gab erst nach 3 maligem Umkrystallisieren aus verdünntem Alkohol richtige Werte.

Die reine Substanz schmolz bei 155°.

0,1060 g Substanz lieferten 13,7 ccm N (25°, 743 mm).

$C_{13}H_{12}N_2$. Ber.: N = 14,28%; gef.: N = 14,09%.

Es sei bemerkt, daß neben Benzaldehyd geringe Quantitäten einer Verbindung überdestillierten, die sich mit Ferrichlorid violett färbte, also jedenfalls ein Oxybenzolabkömmling war.

Phytochemische Reduktionen. XII.

Die Umwandlung von Citronellal in Citronellol.

Von

Paul Mayer und Carl Neuberg.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Kleine Mengen von Aldehyden und zugehörigen Alkoholen kommen verschiedentlich im Tier- und Pflanzenreiche vor. In wirklich beträchtlichem Umfange finden sich beide Körperklassen nebeneinander in Vegetabilien, und zwar in den Familien jener Pflanzen, welche die ätherischen Öle hervorbringen. Man hat wohl längst einen wechselseitigen Übergang dieser Alkohole und Aldehyde der Terpenreihe ineinander angenommen; ein experimenteller Beweis für ein solches Verhalten ist unseres Wissens jedoch noch nicht erbracht worden.

Die mannigfachen Erfahrungen, die wir über die phytochemische Reduktion von Aldehyden der aliphatischen, aromatischen und fettaromatischen Reihe haben machen können[1]), ermutigten uns, die Verwirklichung dieser Reduktion auch in der wichtigen Gruppe der sogenannten olefinischen Terpenaldehyde zu versuchen. Wir verwendeten zum Studium der Reaktion in dieser Reihe das d-Citronellal und ließen auf dasselbe gärende Hefe in der alten Versuchsanordnung einwirken, nachdem sich dieselbe in Vorversuchen hier wieder als brauchbar erwiesen hatte. Trotz der geringen Löslichkeit des Citronellaldehyds in Wasser ist uns bei etwas längerer ausgedehnter Einwirkung der biologischen Reagenzien die Re-

---

[1]) C. Neuberg und Mitarbeiter 1912 bis 1915. — P. Mayer, diese Zeitschr. **62**, 459, 1912.

duktion zum zugehörigen olefinischen Terpenalkohol, dem d-Citronellol, in recht guter Ausbeute geglückt:

$$CH_2 : C(CH_3).CH_2.CH_2.CH_2.CH(CH_3).CH_2.CHO \rightarrow$$
$$CH_2 : C(CH_3).CH_2.CH_2.CH_2.CH(CH_3).CH_2.CH_2OH.$$

Mehr als 50% vom angewandten Citronellal erhielten wir als Citronellol. Das Ausgangsmaterial verschwindet während der Einwirkung der Hefe sehr vollständig. Der nicht reduzierte Anteil wird allem Anscheine nach in komplizierter Weise umgewandelt. Der Grad der Reduktion ist größer als dem Schema der Cannizzaroschen Reaktion entspricht. Der Reaktionsmechanismus ist somit — so wenig wie bei den übrigen Reduktionen, durch Hefen — aufgeklärt worden. Jeder Reduktion entspricht eine Oxydation. Die Aufdeckung der entsprechenden Oxydation ist ein Hauptproblem der Gärungschemie.

Die Ermittelungen der chemischen und physikalischen Konstanten lassen keinen Zweifel darüber, daß auf diesem phytochemischen Wege aus d-Citronellal ein besonders reines d-Citronellol hervorgeht.

Die Überführung von Citronellal in Citronellol durch einen pflanzlichen Organismus besitzt nicht nur ein Interesse für die Pflanzenphysiologie, sondern auch für die Chemie der Gerüche. Schon im Laufe der Hefeneinwirkung erkennt man die Umwandlung des anfänglich vorhandenen Geruchs nach Citronen in den feinen Duft der Rose. Fast durchgehends zeigen Aldehyde und zugehörige Alkohole einen ungleichen Geruch. Nachdem durch unsere Untersuchungen über die zuckerfreien Gärungen der α-Ketosäuren die Bildung von Aldehyden beim Gärungsakt erwiesen ist, darf man wohl annehmen, daß solche phytochemischen Reduktionen an der Entwicklung des Bouquets beteiligt sind.

Experimenteller Teil.

Vier 5-Literflaschen wurden mit 250 g Rohrzucker, 2500 ccm Wasser von 40° und 250 g Unterhefe K beschickt. Nach dem Eintritt einer lebhaften Gärung wurden zu jeder Flasche 12,0 ccm (gleich 10,3 g) reinstes frisch in vacuo destilliertes d-Citronellal, gelöst in je 13 ccm absoluten Alkohols, gefügt. Nach kräftigem Umschütteln hört die Gärung nach kurzer Zeit auf, setzt aber

nach 10 Minuten wieder ein. Da das Citronellal oben schwimmt, muß vielfach geschüttelt werden. Alle vier Flaschen blieben zunächst 12 Stunden bei 30° und dann über Nacht bei Zimmertemperatur stehen. Trotz Einstellens in den Brutschrank von 37° blieb die Gärung äußerst schwach. Sie wurde deshalb durch erneuten Zusatz von 150 g Rohrzucker und 150 g Hefe K wieder entfacht. Es trat eine ganz langsame, sich über 14 Tage erstreckende Gärung ein. Der Inhalt der mit Wattebausch verschlossenen vier Flaschen wurde täglich mindestens 3 mal kräftig umgeschüttelt, und dabei erfüllte sich alsbald der Brutschrank mit dem typischen Rosenduft.

Nach 15 Tagen wurde der gesamte Inhalt der vier Flaschen, der völlig steril geblieben war, mit strömendem Dampfe behandelt, solange noch Tröpfchen übergingen. 24,3 l mußten dazu übergetrieben werden. Dieselben wurden alsdann mit 4 l Äther sorgfältig ausgeschüttelt.

Die vereinigten Ätherauszüge wurden nunmehr auf dem Wasserbade bis auf 700 ccm abdestilliert. Die hinterbliebene Ätherlösung wurde mit 100 ccm Wasser und 100 ccm 25 %iger, von überschüssiger SO_2 freier Natriumbisulfitlösung durchgeschüttelt. Nach alsbaldiger Abtrennung der wässerigen Schicht im Scheidetrichter wurde die Ätherlösung nochmals mit 100 ccm Wasser und 50 ccm Bisulfitlösung kräftig geschüttelt. Dann wurde die von der Sulfitlauge[1]) getrennte ätherische Schicht 3 mal mit 250 ccm Wasser durchgeschüttelt und nunmehr über frisch entwässertem Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration von Glaubersalz und Nachwaschen mit absolutem Äther wurde die Ätherlösung auf 200 ccm konzentriert und zur vollständigen Trocknung nochmals über geglühtem Natriumsulfat 24 Stunden lang aufbewahrt. Die Ätherlösung hinterließ dann beim Abdampfen einen gelblichen Rückstand. 3 Tropfen desselben lieferten beim Schütteln mit 2 ccm fuchsinschwefliger Säure in 12 Stunden keine Spur einer Rötung, während 1 Tropfen Citronellal in 2 ccm fuchsinschwefliger Säure sofort eine intensive

---

[1]) Durch sofortige Zerlegung (vgl. F. Tiemann, Ber. **31**, 3306, 1898; **32**, 813, 1899) wurde eine Spur unverändertes Citronellal zurückgewonnen; eine Bildung von citraldihydrosulfonsaurem Natrium war nicht nachweisbar.

rotblaue Färbung hervorrief. Daraus ergibt sich, daß kein Ausgangsmaterial mehr vorhanden war.

Der beträchtliche Rückstand wurde alsdann im Vakuum bei 10 bis 11 mm Druck unter Verwendung einer Drehvorlage destilliert. Bis 105° ging 1 ccm einer pfefferminzartig riechenden und unscharf siedenden Flüssigkeit über. Von 105 bis 113° destillierten 24,8 g eines nahezu farblosen Öles, das der Hauptmenge nach zwischen 107 und 110° sott. Im Kolben verblieben, über 113° siedend, 8,5 g. Dieser tiefbraune Rückstand reagierte in wässeriger Aufschwemmung oder in alkoholischer Lösung ganz schwach sauer. Citronellsäure war daraus nicht herauszufraktionieren. Somit ergibt sich kein Anhalt dafür, daß die Umwandlung des Citronellals in Citronellol nach dem Schema der Cannizzaroschen Reaktion erfolgt ist. Die Ausbeuten an Reduktionsprodukt sprechen dagegen; die angewandten $4 \times 10{,}3 = 41{,}2$ g Citronellal müßten sonst 20,865 g Citronellol und 22,740 g Citronellsäure liefern.

Durch erneute Destillation der bei 105 bis 110° übergegangenen 24,8 g Flüssigkeit wurden 22,3 g reines Citronellol vom Siedepunkt 107 bis 110° (bei 11 mm Druck) erhalten. Für natürliches Citronellol wird bei 10 mm Druck der Siedepunkt 108 bis 109° angegeben (Beilstein).

Die Analyse bestätigte das Vorliegen von Citronellol; keine Spur des Ausgangsmaterials war in demselben mehr zu entdecken.

0,1008 g Substanz: 0,2849 g CO_2 und 0,1178 g H_2O.
$C_{10}H_{20}O$ ber. C = 76,99; H = 12,82%;
(156) gef. C = 77,08; H = 12,98%.

Zur weiteren Bestätigung wurden das optische Drehungsvermögen sowohl des angewandten Citronellals (a) wie des daraus bei der phytochemischen Reduktion gewonnenen Citronellols (b) bestimmt.

a) Ausgangsmaterial: $[\alpha]_{D_{18}} = +12{,}28^0$
($\alpha = +10{,}50^0$, $l = 1$, $c = 100$, $d = 0{,}8548$).

b) Reduktionsprodukt: $[\alpha]_{D_{18}} = +4{,}32^0$
($\alpha = +3{,}69^0$, $l = 1$, $c = 100$, $d = 0{,}8570$).

In der Literatur[1]) ist als Drehungsvermögen des d-Citronellals der Wert + 12 bis + 13° angegeben, für das d-Citronellol + 4,0°.

Der charakteristische Drehungsabfall beim Übergang von d-Citronellal in d-Citronellol tritt bei unserem Produkt klar zutage. Nach früheren Versuchen mit Allylalkohol und Zimtsäure ist es uns bisher nicht gelungen, die Doppelbindung —CH=CH— phytochemisch zu reduzieren. Auch im vorliegenden Fall haben wir keinerlei Anhalt für eine Beimengung von Dihydrocitronellol gefunden. Letzteres besitzt auch nach L. Bouveault und G. Blanc[2]) einen ganz andern und zwar unangenehmen Geruch, zeigt aber nach den Angaben der Literatur[2])[3]) einen Siedepunkt (Kp_{15} = 118° nach Bouveault und Blanc, Kp_{15} = 109° bis 111° nach Haller und Martine), der dem des Citronellols sehr ähnlich ist. Wir haben deshalb den ungesättigten Charakter unseres Alkohols durch das Additionsvermögen für Brom besonders nachgewiesen. Unser Citronellol nahm in Eisessiglösung augenblicklich Brom auf.

0,3515 g unseres Citronellols, gelöst in 5 ccm Eisessig verbrauchten 22,6 ccm einer Eisessig-Bromlösung, von der 1,0 ccm 0,0159 g Brom enthielt. 22,6 ccm der Bromlösung entsprechen nun 0,3503 g Citronellol, also fast genau der Einwage.

Um noch eine krystallisierte Verbindung des Citronellols zu gewinnen, haben wir nach der Vorschrift von H. Erdmann und P. Huth[4]) das Silbersalz der Citronellylphthalestersäure, $C_{10}H_{19}.OCO.C_6H_4.COOAg$, dargestellt.

Zu diesem Zwecke wurden 2 g des Citronellols mit 2 g Phthalsäureanhydrid in einem weiten Reagensglase unter Verschluß mit einem Chlorcalciumrohr 1 Stunde in lebhaft siedendem Wasserbade erhitzt. Das resultierende Öl wurde 4 mal mit destilliertem Wasser im Wasserbade ausgekocht und der beim Dekantieren übriggebliebene unlösliche Rückstand in 1,4 ccm Ammoniak aufgenommen. Auf Zusatz von 20%iger Silbernitratlösung fiel das Silbersalz aus, im ersten Moment ein wenig ölig, dann erstarrend. Nach 2 stündigem Verweilen im Frigo wurde es ab-

[1]) V. Meyer-Jacobson, Organ. Chem. 1, I, S. 916 und 1005.

[2]) L. Bouveault u. G. Blanc, Ch. C. 1905, I, 25.

[3]) A. Haller u. C. Martine, Ch. C. 1905, II, 135.

[4]) H. Erdmann und P. Huth, Journ. f. prakt. Chem. [2], 56, 40, 1897.

gesaugt und mit kaltem Wasser ausgewaschen; nach völliger Trocknung wurde aus siedendem Methylalkohol umkrystallisiert, woraus es sich in schönen, rein weißen Krystallen vom Schmelzpunkt 123° abschied; Erdmann und Huth geben den Schmelzpunkt zu 120 bis 124° an.

0,3290 g Silbersalz lieferten 0,0861 g Ag.

$C_{18}H_{23}O_4Ag$: ber. Ag = 26,27 %; gef. 26,13 %.
(411)

Das Silbersalz besaß die kennzeichnende Löslichkeit in Äther und Benzol.

Damit war die phytochemische Umwandlung des Citronellals in Citronellol nach jeder Richtung hin sichergestellt; die Ausbeute betrug im bestgelungenen Versuch 59,4 % der Theorie.

Die Umwandlung aliphatischer und aromatischer Sulfosäuren in Aldehyde bzw. Phenole.

Von

Joh. A. Mandel[1]) und **Carl Neuberg.**

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Die Sulfosäuren, von denen Vertreter auch natürlich vorkommen bzw. durch einfachen Abbau von Proteinen[2]) erhalten werden, sind durch ihre große Beständigkeit ausgezeichnet. Sie widerstehen bekanntlich der Einwirkung siedender Laugen und Säuren und werden in der Regel[3]) nur durch Alkalischmelzen oder durch hohe Temperaturen verändert. Nun hat sich das Wasserstoffsuperoxyd in Gegenwart von Eisensalzen nicht nur als ein eigentümlich wirkendes Oxydationsmittel erwiesen, sondern auch als ein hydrolytisch spaltendes Reagens herausgestellt[4]). Diese Erfahrungen veranlaßten uns, das Oxydationsgemisch von Wasserstoffsuperoxyd und Eisensalz auf die so beständigen Sulfosäuren zur Einwirkung zu bringen.

Unsere Erwartungen erfüllten sich: Die Sulfosäuren spalten bei 100° oder bei niedrigerer Temperatur die SO_3H-Gruppe als Schwefelsäure ab und ihr Alkyl- bzw. Arylrest wird oxydiert. Dabei entstehen aus den aromatischen und fettaromatischen Sulfosäuren Aldehyde, aus den Benzolderivaten entsprechende Oxybenzole.

Dieses Verhalten stellten wir fest an der Äthansulfosäure, Aminoäthansulfosäure (Taurin), Benzolsulfosäure und Benzylsulfosäure.

---

1) Gast des Kaiser Wilhelm-Instituts.

2) C. Th. v. Mörner, Zeitschr. f. physiol. Chem. 93, 175, 1914.

3) Vgl. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 33, 2014, 1900.

4) C. Neuberg und S. Miura, diese Zeitschr. 36, 37, 1911.

Neben Schwefelsäure entstanden aus den ebengenannten Sulfosäuren Acetaldehyd, Aminoacetaldehyd, Phenol nebst Resorcin und Brenzcatechin, sowie Benzaldehyd. Die Ausbeuten sind nicht so, daß die Reaktion als Darstellungsmethode in Betracht kommt. Wohl aber verdienen die erwähnten Umwandlungen theoretisches Interesse. In biochemischer Hinsicht scheint uns die Umwandlung des Taurins in ein Derivat des Glykolaldehyds beachtenswert, da sie einen weiteren Beitrag zu der öfter erwogenen Möglichkeit eines Zusammenhangs von Cystin- und Kohlenhydratstoffwechsel liefert.

Experimenteller Teil.

1. Äthansulfosäure.

a) Wir lösten 2,64 g ($^2/_{100}$-mol.) äthansulfosaures Natrium in möglichst wenig Wasser und fügten 0,1 g festes Eisensulfat hinzu. Diese Mischung wurde alsdann mit einigen Tropfen verdünnter Schwefelsäure versetzt, um einem Ausfall von basischem Eisensalz vorzubeugen, und mit 500 ccm $3\,^0/_0$igem Wasserstoffsuperoxyd destilliert. Das Wasserstoffsuperoxyd wurde in Anteilen von je 50 ccm durch einen Tropftrichter zugeführt. Das durch einen Schlangenkühler in eine eisgekühlte Vorlage geleitete Destillat roch stark nach Acetaldehyd und gab eine kräftige Reaktion nach Rimini und mit fuchsinschwefliger Säure. Durch erneute und anreichernde Destillation erhielten wir eine Lösung, die mit essigsaurem p-Nitrophenylhydrazin einen voluminösen Niederschlag ergab (2,5 g). Nach dem Umkrystallisieren aus verdünntem Alkohol schmolz diese Hydrazinverbindung gegen 138° und zeigte einen Stickstoffgehalt von $24{,}6\,^0/_0$. Diese Daten lehren, daß trotz des starken Ausfalls der Aldehydreaktionen kein reines Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon (F. 129°; $N = 23{,}46\,^0/_0$) vorlag. Auch war deutlich eine rötliche Verbindung beigemischt. Erst durch 6 malige Krystallisation aus verdünntem Alkohol gelang es, den hartnäckig anhaftenden Begleiter zu entfernen.

Analyse:

0,0802 g Substanz: 16,4 ccm N bei 757 mm und 18°.
$C_8H_9N_3O_2$. Ber.: $N = 23{,}46\,^0/_0$; gef.: $N = 23{,}41\,^0/_0$.

b) Um noch auf anderem Wege die Entstehung von Acetaldehyd bei der Behandlung von Äthansulfosäure mit Hydroperoxyd und Eisensalz festzustellen, haben wir einen weiteren Versuch mit 2,64 g Ausgangsmaterial vorgenommen. Das direkte Destillat — ca. 500 ccm — wurde mit überschüssigem, frisch bereitetem Silberoxyd mehrere Stunden am Rückflußkühler gekocht. Dabei wird der Acetaldehyd zu Essigsäure oxydiert, die Beimischung aber zerstört.

Unbekümmert um die festen Silbersalze wurde dann die Mischung mit Schwefelsäure angesäuert und im Dampfstrom destilliert solange noch eine saure Flüssigkeit überging. Das gesamte Destillat, rund 6 l, wurde mit Soda schwach alkalisch gemacht und auf dem Wasserbade zur Trockne gedampft. Die zurückgebliebene Salzmasse wurde 2 mal mit 100 ccm absolutem Alkohol und 2 mal mit 100 ccm 95 %igem Sprit ausgekocht. Die vereinigten alkoholischen Auszüge wurden abermals verdampft und der weiße Rückstand in wenig Wasser gelöst. Nach Zusatz eines Tropfens verdünnter Salpetersäure wurde mit 50 %iger Silbernitratlösung gefällt. Das ausgeschiedene weiße Salz wurde nach mehrstündigem Stehen in der Kälte abgesaugt, erst mit Wasser und dann mit absolutem Alkohol bis zum Verschwinden der Nitratreaktion ausgewaschen. Nach dem Trocknen im Vakuum erwies sich das erhaltene Salz (1,4 g) als Silberacetat.

0,2932 g Substanz gaben 0,1892 g Ag.

$CH_3.COOAg$: berechnet Ag = 64,66 %; gefunden 64,53 %.

Damit ist bewiesen, daß die flüchtige Substanz im Destillat aus Äthansulfosäure zu einem beträchtlichen Teile aus Acetaldehyd besteht.

c) Um zu sehen, in welcher Form die Sulfogruppe bei der erwähnten Behandlung mit Wasserstoffsuperoxyd und Eisensalz entfernt wird, haben wir 2,64 g sulfatfreies äthansulfosaures Natrium in der angegebenen Weise mit schwefelsäurefreiem Wasserstoffsuperoxyd sowie mit Ferrochlorür und einigen Tropfen Salzsäure als Katalysator destilliert. Unter Entwicklung eines ozonartigen Geruches geht auch hier Acetaldehyd über, während im Rückstande mit Bariumchlorid reichlich Schwefelsäure nachweisbar wird. Demnach darf man annehmen, daß die Reaktion im Sinne folgender Bruttogleichung verläuft:

$$CH_3CH_2.SO_3H + 2O = CH_3CHO + H_2SO_4.$$

2. Aminoäthansulfosäure.

In Anbetracht der Empfindlichkeit der aus Taurin zu erwartenden Reaktionsprodukte war bei der Aminoäthansulfosäure eine wesentlich andere Arbeitsweise als bei der Äthansulfosäure notwendig. Wir verfuhren folgendermaßen.

10 g Taurin wurden unter Zusatz von 0,1 g Ferrosulfat und einigen Tropfen verdünnter Schwefelsäure in 250 ccm Wasser gelöst und mit 100 ccm 30%igem Wasserstoffsuperoxyd versetzt. Nach 3tägigem Stehen bei Zimmertemperatur, wobei eine Entwicklung von Sauerstoff und Kohlensäure eintrat, wurde die Mischung auf dem Wasserbade erwärmt, bis alles Wasserstoffsuperoxyd verbraucht war und die Chromsäureprobe negativ ausfiel. Das Reaktionsprodukt zeigte gegen Fehlingsche Mischung ein unzweifelhaftes Reduktionsvermögen.

Zur Charakterisierung der Umwandlungsprodukte wurde die Mischung mit einer Lösung von 4 g p-Nitrophenylhydrazin in Essigsäure und mit festem Natriumacetat versetzt. Es fiel alsbald beim Erwärmen auf dem Wasserbade ein rotbrauner Niederschlag aus, der bei mehrstündigem Erhitzen an Menge zunahm. Das abgesaugte Rohprodukt wurde aus der Lösung in Pyridin durch Essigsäure gefällt. Durch Wiederholung dieser Reinigung erhielten wir schließlich ein violettrotes Krystallpulver, das zur Analyse im Vakuum über Schwefelsäure und Ätzkali getrocknet wurde. Die Substanz schmolz gegen 300°.

Analyse.

0,0913 g Substanz gaben 20,22 ccm Stickstoff bei 762 mm und 19,5°.

$C_{14}H_{12}N_6O_4$. Ber.: N = 25,61%; gef.: N = 25,42%.

Demnach ist die Substanz als Glykolaldehyd-p-nitrophenylosazon anzusprechen. Natürlich kann sie sowohl aus der Diose als aus Aminoacetaldehyd oder Glyoxal hervorgegangen sein. Welche von diesen Verbindungen als Umwandlungsprodukt von Taurin auftritt, ist nicht entschieden. Daß im Verlaufe der Wasserstoffsuperoxydeinwirkung in Analogie mit dem Verhalten der Aminosäuren[1]) und Amine[2]) Ammoniak abgespalten wird,

---

[1]) C. Neuberg und F. Blumenthal, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 2, 238, 1902.

[2]) K. Suto, diese Zeitschr. 71, 169, 1915.

geht aus unseren NH_3-Bestimmungen hervor, die wir unmittelbar mit dem Reaktionsprodukt durch Destillation mit MgO vornahmen. Wir erhielten so bei der Verarbeitung von 0,62 g Taurin 0,0714 g NH_3, entsprechend 84,69 % des in Taurin enthaltenen Stickstoffes.

3. Benzylsulfosäure.

Als Beispiel aus der fettaromatischen Reihe wählten wir die Benzylsulfosäure, $C_6H_5.CH_2.SO_3H$. Die Verarbeitung konnte hier in der einfachen Weise wie bei der Äthansulfosäure erfolgen.

3,9 g krystallisiertes benzylsulfosaures Natrium wurden unter Zusatz von 0,1 g Eisensulfat und einigen Tropfen verdünnter Schwefelsäure mit 400 ccm 3 %igem Wasserstoffsuperoxyd destilliert, wobei das Hydroperoxyd in 8 Portionen zu 50 ccm durch einen Tropftrichter hinzugegeben wurde. Das Destillat war schwach milchig getrübt und roch nach Bittermandelöl. Es wurde direkt mit einer Lösung von essigsaurem Phenylhydrazin versetzt. Beim Umschütten ballte sich ein weißer Niederschlag zusammen, der nach 12 stündigem Stehen in einem geschlossenen und eisgekühlten Gefäß abfiltriert wurde. Durch einmaliges Umkrystallisieren des gelben Rohproduktes aus verdünntem Alkohol wurden 0,5 g reines Benzaldehydphenylhydrazon erhalten, das scharf bei 156° schmolz.

0,1120 g Substanz gaben 14,0 ccm Stickstoff bei 758 mm und 18°.

$C_{13}H_{12}N_2$. Ber.: N = 14,28 %; gef.: N = 14,25 %.

Bemerkt sei, daß das Destillat, das den Benzaldehyd enthielt, mit Eisenchlorid eine schwach violette Färbung ergab, die auf ein flüchtiges hydroxyliertes Benzolderivat hinweist.

4. Benzolsulfosäure.

Eine Lösung von 3,6 g Natriumsalz der Benzolsulfosäure, $C_6H_5.SO_3H$, in 100 ccm 3 %igem Wasserstoffsuperoxyd wurde nach Zusatz von 0,1 g Eisensulfat und einigen Tropfen verdünnter Schwefelsäure 24 Stunden im Brutschrank bei 37° aufbewahrt. Dann wurde die Reaktionsmischung zu $^2/_3$ am absteigenden Kühler abdestilliert. Es ging Phenol über, nachweisbar durch Bromwasser und Millons Reagens. Der im Kolben verbliebene Rück-

stand wurde mit einer konzentrierten Bariumacetatlösung von Schwefelsäure befreit und dann mit Bleiessig ausgefällt. Der gut ausgewaschene Niederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff in wässeriger Suspension zerlegt. Es resultierte eine Flüssigkeit, die nach Konzentration auf dem Wasserbade die Reaktionen des Brenzcatechins gab. Mit Eisenchlorid entstand eine Grünfärbung, die mit Ammoniak violett wurde. Im Filtrat der Bleiessigfällung war nach Behandlung mit Schwefelwasserstoff und nach Filtration von Bleisulfid sowie nach dem Einengen auf dem Wasserbade Hydrochinon durch die Probe von Denigès (grünlicher Ring bei Unterschichtung der in Alkohol gelösten Substanz mit Natronlauge) nachweisbar. Daneben war auch Resorcin durch die beständige Violettfärbung mit Eisenchlorid sowie durch die Bromwasserreaktion mit Wahrscheinlichkeit zu erkennen.

Daraus geht hervor, daß bei den aromatischen Sulfosäuren, ähnlich wie beim Benzol selbst [1]), statt der nicht möglichen Aldehydbildung eine Kernhydroxylierung unter Bildung von Phenol und Dioxybenzolen eintritt.

5.

Auch bei der p-Phenolsulfosäure, $C_6H_4(OH)SO_3H$, haben wir einen ähnlichen Reaktionsverlauf festgestellt. Verwendet man das Natriumsalz und nimmt als Katalysator Ferrochlorid, so läßt sich ohne weiteres die abgespaltene Schwefelsäure erkennen. Die anfangs grüne Lösung färbt sich schnell braun und bald ist Sulfat nachweisbar, fast augenblicklich beim Kochen. Dabei riecht die Lösung nach Chinon und zugleich nach Karamel.

---

[1]) C. J. Cross, E. Bevan und T. Heiberg, Ber. **33**, 2017, 1900.

Darstellung einer scymnolschwefelsäureartigen Substanz. Cholesterinschwefelsäure.

Von

Joh. A. Mandel[1]) **und Carl Neuberg.**

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Im Jahre 1897 entdeckte Olof Hammarsten[2]) in der Galle der Haifische eine neue Reihe gepaarter Gallensäuren. Diese unterscheiden sich von den Gallensäuren aller übrigen Tiere dadurch, daß weder die Vertreter der gewöhnlichen Cholsäuregruppe noch deren übliche Paarlinge, Glykokoll oder Taurin, vorliegen. Es handelt sich vielmehr um Ätherschwefelsäuren, um esterartige Verbindungen der Schwefelsäure mit Substanzen, die ihren Eigenschaften nach eine Mittelstellung zwischen Cholesterin und Cholsäure einnehmen. Hammarsten hat gefunden, daß in der Haifischgalle zwei derartige einander ähnliche Ätherschwefelsäuren vorkommen, die er als α- und β-Scymnolschwefelsäure bezeichnet hat. Diese beiden gepaarten Säuren zerfallen bei der Hydrolyse in Schwefelsäure und α- und β-Scymnol. Letzteres hat vermutlich die Formel $C_{29}H_{50}O_5$, ersteres die Zusammensetzung $C_{27}H_{46}O_5$. Hammarsten hebt hervor, daß das α-Scymnol sich bei gewissen Reaktionen wie oder fast ganz wie das Cholesterin verhält. Er weist weiter darauf hin, daß auch in der Galle des Menschen und der Säugetiere vielleicht kleine Mengen solcher Ätherschwefelsäuren vorkommen.

Das Interesse, das diese eigenartigen Körper der Scymnolschwefelsäurenreihe besitzen, war uns Veranlassung, eine

[1]) Gast des Kaiser Wilhelm-Institutes.

[2]) O. Hammarsten, Zeitschr. f. physiol. Chem. 24, 322, 1897.

künstliche Darstellung solcher Ätherschwefelsäuren zu versuchen. Es ist uns zunächst möglich gewesen, eine Cholesterinschwefelsäure darzustellen, die eigentümliche Eigenschaften aufweist und deren Darstellung sowie Verhalten wir im folgenden beschreiben.

Gewinnung von Cholesterinschwefelsäure.

Bis vor kurzem waren nur nach der alten Methode von E. Baumann einige Ätherschwefelsäuren von Phenolen dargestellt worden. Im Jahre 1910 zeigten sodann C. Neuberg und H. Pollak[1]), daß sich der Rest der Schwefelsäure auch in Zuckerarten sowie in Aminosäuren einführen läßt, und zwar sowohl mit Hilfe von Kaliumpyrosulfat und Kalilauge als mit den beiden Chloriden von Schwefelsäure, dem Sulfurylchlorid und der Chlorsulfonsäure. Diese „Sulfurylierung" verläuft analog der von Neuberg und seinen Mitarbeitern ausgeführten Phosphorylierung, die mit den Chloriden der Phosphorsäure bewerkstelligt wird. Während wir früher diese Sulfurylierung und Phosphorylierung in wäßriger Lösung bei Gegenwart geeigneter anorganischer Basen vornahmen, hat sich inzwischen gezeigt[2]), daß die bei Acylierungen oft erprobte Verwendung wasserfreier organischer Basen[3]) auch für die Handhabung der anorganischen Säurechloride geeigneter ist. Insbesondere für die Verwendung der Chlorsulfonsäure hat bereits A. Verley[4]) die Benutzung von Pyridin empfohlen. In Anlehnung an dieses Verfahren haben wir gleichfalls für unseren Zweck wasserfreies Pyridin verwendet und das Sulfurylierungsmittel — wie in unseren vorerwähnten Arbeiten das phosphorylierende Agens — in Chloroform gelöst.

Für die

Sulfurylierung des Cholesterins

[1]) C. Neuberg und H. Pollak, diese Zeitschr. 23, 515, 1910; Berichte 33, 2060, 1910. Siehe ferner C. Neuberg und E. Kretschmer, diese Zeitschr. 36, 5, 1911.

[2]) Emil Fischer, Sitzungsber. d. Preuß. Akad. der Wissensch. vom 25. VI. 1914; Ber. 47, 3193, 1914.

[3]) Die Acylierung in Gegenwart von Pyridin ist 1895 von A. Deninger entdeckt und von Einhorn ausgebildet, s. bei Lassar-Cohn, IIa, S. 5, 1907.

[4]) A. Verley, Chem. Centralbl. 1901, I, 313.

ist die Verwendung reinster Reagenzien empfehlenswert, da nur sie den quantitativen Verlauf der Reaktion gewährleisten. Das Cholesterin, das bekanntlich bei der gewöhnlichen Art der Reinigung mit einem Molekül Wasser ausfällt, wird erst aus Chloroform umkrystallisiert, dann im Luftbade bei 100° und schließlich im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure getrocknet. Das Pyridin wird über Bariumoxyd destilliert und alkoholfreies Chloroform über Chlorcalcium getrocknet. Als Chlorsulfonsäure kann das Handelsprodukt (Kahlbaum) Verwendung finden.

Die Sulfurylierung vollzieht sich im Sinne der Gleichung:

$$C_{27}H_{45}.OH + Cl.SO_3H = HCl + C_{27}H_{44}.O.SO_3H.$$

A. Darstellung von cholesterinschwefelsaurem Kalium.

I. 2 g Chlorsulfonsäure wurden tropfenweise in ein gut gekühltes und trockenes Gemisch von 30 ccm Chloroform und 12 ccm Pyridin eingetragen. Bei richtiger Ausführung der Operation befindet sich das Pyridinchlorsulfonat in Lösung. Zu dieser gibt man die Auflösung von 6,5 g Cholesterin in 20 ccm Chloroform und spült das Gefäß mit noch 5 ccm Chloroform aus. Nach 15 minutigem Stehen, währenddessen etwa ausgefallenes Pyridinchlorsulfat durch Schütteln in Reaktion gebracht wird, erwärmt man die in einem Destillationskolben befindliche Mischung nach Verschluß mit Chlorcalciumröhren 15 Minuten auf ca. 50° (Wasserbad). Aus der ganz klaren Lösung destilliert man alsdann im Vakuum (Außentemperatur 40°) die Lösungsmittel ab, solange noch etwas übergeht. Dabei verflüchtet sich das gesamte Chloroform und ein Teil des Pyridins. Zur völligen Austreibung des letzteren saugt man durch die Capillaren des Destillationskolbens 50 ccm 2n-KOH ein und dampft nunmehr zur Trocke[1]). Dabei tritt anfangs Schäumen

[1]) Dabei tritt vorübergehend eine intensiv rotviolette Färbung auf. An ihrem Zustandekommen sind Cholesterinverbindungen nicht beteiligt. Vielmehr fanden wir, daß Chlorsulfonsäure mit Pyridin und nachherig zugesetztem Alkali dieselbe recht beständige Färbung gibt, die sich, wenn nicht spurenhafte Verunreinigungen des Pyridins im Spiele sind, wohl zur Erkennung des Pyridins eignen dürfte. Auch mit reinstem Pyridin des Handels tritt die Probe ein. Sie ist so anzustellen, daß Pyridin im Überschuß vorhanden ist: 2 Tropfen Pyridin werden mit 1 Tropfen Chlorsulfonsäure versetzt. Die Mischung wird eine Minute im Wasser-

ein, das man mittels Durchsaugen eines mit Ätherdampf beladenen Luftstromes mäßigen oder durch sanftes Rühren des soliden Capillarrohres beseitigen kann[1]). Das Schäumen hört übrigens nach kurzer Zeit plötzlich auf. Diese Destillation, bei der das Pyridin abgetrieben wird, nimmt man zweckmäßig bei 50° Badtemperatur vor. Im Destillationskolben hinterblieb eine schwach gelbbraune Krystallmasse, die zur Austreibung der letzten Pyridinreste 2 mal mit je 50 ccm absolutem Alkohol zur Trockne verdampft wird. Der Rückstand wird alsdann mit ca. $^1/_4$ l Äther gründlich ausgekocht. Der abfiltrierte Äther liefert beim Abdunsten eine kleine Menge nicht in Reaktion getretenen Cholesterins zurück. Der mit Äther behandelte Kolbenrückstand wird mit 50 ccm Wasser erwärmt und damit nach dem Abkühlen einige Stunden in Berührung gelassen. Das Wasser nimmt Chloride und Spuren von Sulfaten auf, sowie etwa überschüssige Kalilauge. Beim Absaugen der gelblichen Flüssigkeit hinterbleibt ein schon recht reines, nahezu farbloses, schwerlösliches, organisches Kaliumsalz. Durch einmaliges Umkrystallisieren aus 500 ccm 80%igen Alkohols liefert es reines cholesterinschwefelsaures Kalium. Beim Abkühlen scheidet sich dasselbe zunächst in Form einer steifen Gallerte ab, die aber bei 12stündigem Stehen in der Kälte in ein Magma feiner Nadeln übergeht, die sich leicht absaugen lassen und mit etwas verdünntem Alkohol gewaschen werden. Die Ausbeute an diesem Produkt betrug 5,0 g und eine weitere Menge von 1,5 g fiel aus den eingeengten Mutterlaugen aus. Die gesamte Ausbeute betrug demnach 7,5 g = 89% der Theorie.

Die neue Verbindung enthält Kalium und Schwefel.

---

bade erhitzt, dann unter fließendem Wasser abgekühlt und die erstarrte Masse mit starker Lauge vorsichtig bis zum Eintritt der Färbung versetzt, deren Nuance zwischen der von Fuchsin und Hämoglobin liegt. Bei Verdünnung mit Alkohol wird die Lösung mehr violett und zeigt einen breiten Absorptionsstreifen im Grün. 0,01 ccm Pyridin konnten wir so nachweisen. Statt Chlorsulfonsäure kann auch Phosphoroxychlorid verwendet werden. Der Farbstoff steht vielleicht zu den von Königs, Zincke und Reitzenstein beschriebenen Verbindungen des Pyridins bez. Glutacondialdehyds in Beziehung.

[1]) Bei Verarbeitung größerer Mengen empfiehlt es sich, die Flüssigkeit im Faust-Heimschen Apparat bei 40° zur Trockne zu verdampfen.

Wegen der Schwerlöslichkeit der Substanz wurden die Analysen folgendermaßen ausgeführt.

a) Schwefelbestimmung. 0,2844 g Substanz wurden mit Soda-Salpeter geschmolzen und lieferten 0,1296 g $BaSO_4$.

b) Zur Bestimmung des Kaliums wurde die Substanz in Eisessig gelöst und nach Zusatz einiger Tropfen Salzsäure sowie von Alkohol mit Platinchlorid gefällt. Dieses einfache Verfahren vermeidet die Umständlichkeiten der Veraschung, und wir möchten es für ähnliche Fälle empfehlen, wo es sich um die Analyse wasserunlöslicher, dagegen in organischen Solvenzien löslicher Kalisalze handelt.

Auf diese Weise erhielten wir aus 0,2586 g cholesterinschwefelsaurem Kalium 0,1204 g K_2PtCl_6.

$C_{27}H_{45}OSO_3K$. Berechnet: S = 6,35; Kalium = 7,74 %;
(504) gefunden: S = 6,25; Kalium = 7,51 %.

Nach dem Ausfall der Analyse unterliegt es keinem Zweifel, daß hier das Kaliumsalz des sulfurylierten Cholesterins vorliegt. Auffallend ist seine große Schwerlöslichkeit. In reines Wasser gehen selbst in der Siedehitze überhaupt keine nennenswerten Mengen über, während 80%iger Alkohol ein brauchbares Lösungsmittel darstellt.

Theoretisch war es möglich, daß die Chlorsulfonsäure mit dem Cholesterin in komplizierter Weise in Reaktion getreten war, eventuell unter Anlagerung an die Doppelbindung. Es war daher notwendig, das Vorliegen des Cholesterinmoleküls und des Schwefelsäurerestes in der Substanz darzutun. Wir haben diesen Beweis auf verschiedenen Wegen erbracht.

α) Zunächst stellten wir fest, daß der Schwefel hydrolytisch in Form von Schwefelsäure leicht abspaltbar ist.

Zu diesem Zweck lösten wir 2 g Kalisalz in 50 ccm wasserfreiem Eisessig und kochten 6 Stunden lang am Rückflußkühler. Aus der klaren Mischung schieden sich beim Erkalten Krystalle ab, die abfiltriert und mit Äther ausgewaschen wurden. Sie erwiesen sich als reines Kaliumbisulfat, $KHSO_4$. Das Eisessig und Äther enthaltende Filtrat wurde im Vakuum eingeengt. Es hinterblieb ein nahezu farbloser Sirup, der beim Anrühren mit Alkohol erstarrte. Dieses Produkt wurde aus Alkohol umkrystallisiert und erwies sich als das bekannte Ace-

tylcholesterin; offenbar wird der Schwefelsäurerest durch die Acetylgruppe ausgetauscht[1]). Die Verbindung schmolz bei 112°, während für die reine Acetylverbindung der Schmelzpunkt 113° angegeben wird. Beim Schmelzen zeigten die Krystalle das prächtige Farbenspiel acetylierter Cholesterine; insbesondere tritt sehr schön die Smaragdfärbung und der blaurote Perlmutterglanz beim Abkühlen der auf dem Uhrglase geschmolzenen Probe ein[2]), Erscheinungen, die man auf Trimorphismus oder auf Bildung flüssiger Krystalle bezieht.

β) Auf folgendem Wege gelang es, auch das Cholesterin in Substanz aus dem Kaliumsalz abzuspalten.

1,0 g trockenes Kaliumsalz wurde in einem Einschmelzrohr mit 25 ccm Salzsäure (D = 1,12) übergossen und nach dem Verschließen 12 Stunden lang im Willstätterschen Wasserbade erhitzt. Nach dem Öffnen des Rohres befand sich am Boden eine völlig veränderte weiße Krystallmasse, die abfiltriert und mit heißem Wasser mehrfach ausgewaschen wurde. Nach dem Trocknen im Vakuum, dann im Trockenschrank wurden 0,763 g Cholesterin gewonnen, das nach einmaligem Umkrystallisieren aus Chloroform den Schmelzpunkt 147° zeigte. Im Filtrat war die abgespaltene Schwefelsäure als Bariumsulfat nachweisbar. Theoretisch waren 0,766 g Cholesterin zu erwarten.

Übrigens hat auch die freie Cholesterinschwefelsäure eine gewisse Beständigkeit. Suspendiert man das Kaliumsalz in der berechneten Menge n-Salzsäure und läßt unter häufigem Umschütteln in der Kälte stehen, so sind nach 36 Stunden nur Spuren Schwefelsäure in Freiheit gesetzt. Diese Beständigkeit der Cholesterinschwefelsäure darf man wohl mit der Höhe ihres Molekulargewichts in Verbindung bringen. Denn die in gewisser Beziehung ähnliche phosphorylierten Aminosäuren, Peptone und Proteine zeigen ebenfalls eine mit zunehmender Molekulargröße wachsende Beständigkeit[3]).

Das cholesterinschwefelsaure Kalium schmilzt unter Aufschäumen bei 235°.

II. Da sich ergeben hatte (siehe vorher S. 189), daß bei den

---

[1]) In einem anderen Falle, wo mit nicht ganz wasserfreiem Eisessig nur kürzere Zeit gekocht worden war, resultierte Cholesterin selbst.

[2]) Vgl. Beilstein, II, S. 1073.

[3]) C. Neuberg und W. Oertel, diese Zeitschr. 60, 496, 1914.

verwendeten Mengenverhältnissen ein kleiner Teil Cholesterin nicht in Lösung getreten war, so haben wir versucht, die Ausbeute zu verbessern. Dies gelingt durch Anwendung eines Überschusses von Chlorsulfonsäure. Wir verfuhren folgendermaßen:

Zu einer klaren Lösung von 4 g Chlorsulfonsäure in 35 ccm Chloroform und 5 ccm Pyridin wurde eine Lösung von 6,5 g Cholesterin in 15 ccm Pyridin unter Nachwaschung mit 5 ccm Pyridin gegeben. Das Gemisch wurde eine Viertelstunde in Eis belassen und dann ebenso lange unter Ausschluß von Feuchtigkeit auf dem Wasserbade auf 50° erhitzt. Die weitere Verarbeitung geschah in der vorher erwähnten Weise, indem nacheinander Chloroform und Pyridin abdestilliert und der mit Alkohol abgedampfte Rückstand nach Zusatz von 50 ccm 2 n-Kalilauge wieder zur Trockne gebracht wurde. Dieses Mal entzog Äther dem Salzgemische nur Spuren bräunlicher Verunreinigungen, aber kein unverändertes Cholesterin. Der feste Rückstand wurde wie früher mit Wasser von anorganischen Salzen befreit und aus 80%igem Alkohol umkrystallisiert. Die Ausbeute betrug 7,55 g, d. h. 90% der Theorie. Wir vermerken dazu, daß hier die Mutterlaugen nicht aufgearbeitet worden sind.

B. Darstellung von cholesterinschwefelsaurem Natrium.

Die Gewinnung dieser Substanz geschieht genau wie die des Kaliumsalzes nach dem sub A. II. angegebenen Verfahren, nur unter Benutzung von 2 n-Natronlauge an Stelle der Kalilauge.

Bei Verwendung der doppelten Menge sämtlicher Ingredienzien erhielten wir aus 13 g Cholesterin 14 g analysenreines Natriumsalz.

Auch das Natriumsalz scheidet sich zunächst in Form einer eigentümlichen Gallerte aus 80%igem Alkohol aus. Es wird durch 12 stündiges Stehen krystallinisch und bildet alsdann seidenglänzende Nadeln. Das im Vakuum getrocknete Salz ist wasserfrei und schmilzt bei 163 bis 164° unter Zersetzung.

0,3014 g Substanz lieferten 0,1480 g $BaSO_4$ = 6,74 % S.

Bei dem Natriumsalz aus einem anderen Ansatze fanden wir in 0,3034 g Substanz 0,1402 g $BaSO_4$ = 6,35 % S.

Für die reine Verbindung, $C_{27}H_{45}O.SO_3Na$, berechnet sich $S = 6,55\,\%$.

Vom Kaliumsalz unterscheidet sich die Natriumverbindung durch ihre größere Löslichkeit.

Beim Kochen mit viel heißem Wasser geht ein Teil des Na-Salzes in kolloidale Lösung. Eine wirklich klare Auflösung erfolgt bei Gegenwart von Spuren Alkohol. Die Flüssigkeit ist auch nach dem Abkühlen völlig klar, wird aber bei längerem Aufbewahren trübe, ja, es kann zur Ausflockung kommen. Durch Erwärmen erfolgt stets wieder völlig klare Lösung, und man kann dieses Spiel ohne Zersetzung des Salzes beliebig wiederholen. Die Reaktion bleibt dabei dauernd neutral.

An dem Natriumsalz stellten wir auch fest, daß es in alkoholischer Lösung mit Digitonin so wenig wie die organischen Ester des Cholesterins reagiert.

Das beste Mittel zur Reinigung des Natriumsalzes ist, wie erwähnt, 80%iger Alkohol. Es löst sich auch in Methylalkohol derselben Konzentration sowie schwierig in Aceton; es ist unlöslich in Chloroform, Schwefelkohlenstoff und Äther. Das Natriumsalz zeigt in alkoholisch-wäßriger Lösung, wie zu erwarten war, ein Drehungsvermögen, und zwar ist dasselbe nach links gerichtet. Wegen der Schwerlöslichkeit ist nur die Benutzung sehr dünner Lösungen[1]) möglich. 0,1100 g cholesterinschwefelsaures Natrium in 30,0 ccm 80 vol.-%igem Äthylalkohol drehte bei 25° im 2-dcm-Rohr = 0,22° nach links. Daraus ergibt sich

$$[\alpha]_{D\,25} = -3,0^\circ.$$

C. Darstellung des Ammoniumsalzes von sulfuryliertem Cholesterin.

Die Gewinnung geschah nach der verbesserten Vorschrift für die Darstellung des Kaliumsalzes (siehe S. 192), nur wurde an Stelle der 2 n-Kalilauge 2 n-Ammoniak in geringem Überschuß verwendet.

Das Ammoniumsalz wird am besten aus 50%igem Alkohol umkrystallisiert. Es bildet gleichfalls zunächst eine Gallerte,

---

[1]) Die ca. 0,37%ige Lösung konnte nur in übersättigtem Zustande bei 25° polarisiert werden; natürlich ist der Wert nicht völlig scharf.

die freiwillig in nadelförmige Krystalle übergeht. Schmelzpunkt gegen 185° unter Aufblähung.

Die Reinheit des Salzes wurde durch eine Ammoniakbestimmung kontrolliert.

0,7678 g Substanz lieferten bei der Destillation mit überschüssiger Natronlauge von 40% 0,0272 g Ammoniak.

$C_{27}H_{45}O.SO_3NH_4$. Berechnet $NH_3 = 3{,}52\%$; gefunden $NH_3 = 3{,}54\%$.

D. Andere Salze der Cholesterinschwefelsäure.

Wegen der zumeist großen Unlöslichkeit der übrigen Salze geht man zu ihrer Gewinnung zweckmäßig von der Natriumverbindung aus. Die 0,5%ige Lösung des Natriumsalzes in lauwarmem alkoholhaltigem Wasser gibt flockige, unlösliche Niederschläge mit Bariumchlorid, Calciumchlorid, Magnesiumsulfat, Kupfersulfat, Bleiacetat, Bleiessig, Eisenchlorid und Zinksulfat; löslich sind das Quecksilber- und Silbersalz. Letzteres kann man bei Zugabe von 50%igem Silbernitrat auch in festem Zustande gewinnen. Die 0,5%ige Lösung des Natriumsalzes wird durch konzentrierte Natronlauge sowie Kalilauge gefällt. Sie liefert bemerkenswerterweise auch mit Kaliumacetat eine Fällung, da das Kaliumsalz eben viel schwerer löslich ist als die Natriumverbindung.

E. Die Farbenreaktionen der cholesterinschwefelsauren Alkalisalze.

1. Salkowskische Reaktion: Da man in Chloroform nur aufschwemmen und nicht lösen kann, so bleibt die Reaktion in der Kälte negativ. Bei längerem Stehen oder schneller beim Erwärmen wird sie positiv[1]).

2. Liebermannsche Reaktion: Obgleich die Salze nur in Suspension angewendet werden können, ist die Reaktion mit Essigsäureanhydrid positiv. Man beobachtet folgendes Farbenspiel: anfangs violett, dann blau, später grünlich.

3. Neuberg-Rauchwergersche Reaktion: Die Ringprobe ist bei Anstellung in alkoholischer Suspension nicht sehr

[1]) Hier erfolgt, ebenso wie bei den beiden folgenden Proben mehr oder minder schnell Hydrolyse.

kräftig. Beim Vermischen tritt gelbrote Färbung auf, die langsam von selbst, schneller bei gelindem Erwärmen sich vertieft; nach Zusatz von Alkohol wird das Gemisch dann schwach himbeerfarben. Typisch verläuft die Probe, wenn man das Alkalisalz in Eisessig löst, 2 Tropfen eisessigsaure Rhamnoselösung hinzufügt und mit konz. H_2SO_4 unterschichtet. Es tritt dann der blauviolette Ring auf. Erwärmt man nach Durchmischung vorsichtig, so wird die ganze Flüssigkeit kirschrot und auf Zugabe von Alkohol himbeerfarben. Der charakteristische Absorptionsstreifen im Grün ist dann vorhanden.

Weiter haben wir gefunden, daß verschiedene dem Cholesterin nahestehende Verbindungen, insbesondere die Cholsäure, sich in der angegebenen Weise sulfurylieren lassen. Wir gedenken das Studium dieser Verbindungen in chemischer wie biologischer Hinsicht fortzusetzen.

Über ein einfaches Verfahren zur Erkennung und Bestimmung von Metalloiden in organischen Verbindungen.

Von

Joh. A. Mandel[1]) **und Carl Neuberg.**

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Im Laufe der Zeit ist eine große Reihe von Methoden in Vorschlag gebracht worden, die zur Bestimmung der Halogene, des Schwefels sowie des Phosphors in organischen Verbindungen dienen. Das Ideal eines solchen Verfahrens wäre eine Methodik, die der organischen Elementaranalyse entsprechend, die Metalloide unmittelbar in einer zur Bestimmung geeigneten Form ergeben würde. Die im Gebrauch befindlichen Verfahren laufen auf eine Veraschung in trocknem oder nassem Zustande hinaus, bei der das in organischer Bindung vorhandene Element in der Regel auf oxydativem, gelegentlich auch auf reduktivem [2]) Wege in eine Bestimmungsform übergeführt wird. Insbesondere zwei Mängel werden bei den bisherigen Methoden empfunden, einmal die Langwierigkeit der Vorbehandlung (Aufschließen mit rauchender Salpetersäure oder konzentrierter Schwefelsäure), dann die massenhafte Belastung mit fremden Substanzen (Soda-Salpeterschmelze, Ätzkalk- oder Natriumsuperoxydverglühung oder Kalischmelze). Der ideal einfachen Verbrennung nähert sich nun ein Verfahren, freilich ohne es voll zu erreichen, das wir im folgenden beschreiben wollen. Die Grundlage bilden die Beobachtungen, daß Wasserstoffsuperoxyd in Gegenwart von Eisensalzen nicht nur

---

[1]) Gast des Kaiser Wilhelm-Instituts.

[2]) Vergl. Busch u. Stöve, Zeitschr. f. angew. Chem. 27, 432, 1914.

zu den bekannten Oxydationen befähigt ist, sondern auch desaminierend[1]), hydrolytisch spaltend[2]) und isomerisierend[3]) wirkt.

Durch Verwendung höher konzentrierten Wasserstoffsuperoxyds kann man die katalytische Verbrennung der organischen Substanzen nun so beschleunigen und vervollständigen, daß dieses Verfahren eine brauchbare Analysenmethode liefert, und zwar hauptsächlich in qualitativer, aber auch in quantitativer Hinsicht. Das neue Verfahren konnte bisher keineswegs auf alle Typen metalloid-organischer Verbindungen angewendet werden, auch haben sich, wie das für eine einzelne Analysenmethode selbstverständlich ist, nicht alle Substanzen für diese Art von Behandlung geeignet erwiesen. Wir geben im folgenden die mit Erfolg analysierten Substanzen an, die den allerverschiedensten Gruppen der organischen Körper zugehören.

Der Vorteil des Verfahrens beruht in der Möglichkeit, in offenen Gefäßen zu arbeiten. So kommt es, daß vorwiegend die nichtflüchtigen Substanzen der gedachten Behandlung zugänglich sind. Aber auch flüchtige Körper haben wir analysieren können, wenn ihr Siedepunkt hoch liegt und sie am aufsteigenden Energiekühler kondensierbar sind.

Die Ausführung des Verfahrens ist so einfach, daß wir nicht daran zweifeln, daß es in vielen Fällen Anwendung finden kann, namentlich bei Massenuntersuchungen, wo man sich durch einen Vorversuch über die prinzipielle Anwendungsmöglichkeit durch den Vergleich mit einem der alten Verfahren leicht vergewissern kann.

Es hat sich herausgestellt, daß man je nach der Natur der zu analysierenden Körper in saurer wie in alkalischer (ammoniakalischer Lösung) arbeiten kann, und daß nach Bedarf Wasser oder organische Solvenzien Benutzung finden können. Von letzteren bewährt sich besonders der Eisessig, der für eine sehr große Anzahl organischer Körper ein ausgezeichnetes Lö-

---

[1]) C. Neuberg und F. Blumenthal, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 2, 241, 1902.

[2]) C. Neuberg und S. Miura, diese Zeitschr. 36, 37, 1911; J. A. Mandel und C. Neuberg, diese Zeitschr. 71, 180, 1915.

[3]) C. Neuberg und B. Rewald, diese Zeitschr. 67, 127, 1914; 71, 158, 1915.

sungsmittel darstellt, selbst aber von der Oxydationsmischung nur sehr wenig angegriffen wird. (Es entsteht Glyoxylsäure.)

Wie die Methodik sich den einzelnen Körperklassen anzupassen hat, geht aus den Beispielen hervor, die wir mitteilen.

Als gemeinsame Vorbemerkung möchten wir nur über die Art des zu verwendenden Wasserstoffsuperoxyds folgendes hervorheben: Das 10-volumenprozentige Wasserstoffsuperoxyd des Handels ist bekanntlich zum Zwecke der Haltbarmachung mit kleinen Mengen von Säuren versetzt (Schwefelsäure, Salzsäure oder Phosphorsäure). Man kann diese Beimengungen zwar durch geeignete Vorbehandlung entfernen, aber dieses Material ist wegen der großen Verdünnung überhaupt nicht sehr empfehlenswert. Vortrefflich geeignet ist dagegen das konzentrierte Wasserstoffsuperoxyd, das Perhydrol, das 30 Gewichtsprozente = 100 Volumenprozente H_2O_2 enthält. Allein seiner regelmäßigen und ausgedehnten Verwendung steht der hohe Preis entgegen. Wir fanden nun ein außerordentlich brauchbares Material in dem 15-gewichtsprozentigen = 50 volumenprozentigen Wasserstoffsuperoxyd der Firma E. Merck, Darmstadt, die uns in dankenswerter Weise auch ein größeres Quantum dieses schönen Reagenzes für unsere Versuche zur Verfügung gestellt hat. Dieses Hydroperoxyd[1]) ist frei von Phosphorsäure[2]) und Schwefelsäure, enthält aber Spuren Halogen, die häufig so gering sind, daß sie vernachlässigt werden oder leicht ein für allemal in einem größeren Quantum des bezogenen Reagenzes bestimmt werden können.

A. Phosphorbestimmungen.

a) Hefenucleinsäure.

1. 0,3510 g lufttrockene Hefenucleinsäure wurden in einem langhalsigen Kjeldahlkolben zu 800 ccm aus Jenenser

---

[1]) Der Preis dieses 15 Gewichtsprozent enthaltenden Wasserstoffsuperoxyds ist ungefähr der gleiche wie der für dieselbe Menge H_2O_2 in Form von 3 %iger Handelsware.

[2]) Bei einer Prüfung auf Phosphorsäure mit Ammoniummolybdat muß man das Wasserstoffsuperoxyd zunächst zerstören, am einfachsten durch Verdampfen einer Quantität des Hydroperoxyds in einer Platinschale; denn H_2O_2 gibt auf Zusatz von Ammoniummolybdat eine gelbe Färbung, die von höheren Molybdänoxyden herrührt, aber keinen Niederschlag. (S. bei Gmelin-Kraut III. 1, S. 909; 7. Aufl. 1912.)

Glas[1]) mit 3 ccm Wasser, 3 Tropfen rauchender Salpetersäure sowie mit 15 ccm 15-gewichtsprozentigen Wasserstoffsuperoxyds übergossen und $^1/_{10}$ g festes Ferrinitrat hinzugegeben. Bei vorsichtigem Erwärmen, das auf dem Wasserbade und bei einiger Übung auch auf freier Flamme beziehungsweise auf dem Drahtnetz erfolgen kann, tritt alsbald eine lebhafte Reaktion ein. Sie verläuft dann ohne weitere Wärmezufuhr, und es ist nötig, die Flamme zu entfernen. Sobald die heftige Gasentwicklung zu Ende ist, erhitzt man abermals, um an einer wieder einsetzenden Gasentwicklung zu prüfen, ob noch unverbrauchtes Wasserstoffsuperoxyd vorhanden ist; zutreffendenfalls erfolgt dann eine neue kräftige Reaktion. Falls diese abgelaufen oder wenn sie gar nicht eingetreten ist, gibt man nochmals 15 ccm des selben Wasserstoffsuperoxyds hinzu und verfährt wie vorher. Nach Beendigung der Reaktion fügt man noch in der Wärme 3 g festes Ammoniumnitrat hinzu und fällt mit 50 ccm Molybdänlösung[2]). Der Molybdänniederschlag wird in gewohnter Weise abfiltriert und wegen des Gehaltes an Eisen gut mit Ammoniumnitratlösung ausgewaschen. Die weitere Verarbeitung geschieht wie üblich, und der Phosphor wird als Magnesiumpyrophosphat zur Wägung gebracht.

Erhalten wurden 0,1004 $Mg_2P_2O_7$ (= 0,0280 g P) = 7,98 % P.

2. In einem zweiten Versuche wurden 0,5460 g Hefenucleinsäure ebenso behandelt, aber mit 50 ccm 15 %igem Wasserstoffsuperoxyd oxydiert.

Gefunden wurden 0,1584 g $Mg_2P_2O_7$ (= 0,0441 g P) = 8,07 % Phosphor.

3. Eine Kontrollanalyse derselben Hefenucleinsäure nach dem Verfahren der Sodasalpeterschmelze, die Herr Dr. Rewald freundlichst ausgeführt hatte, ergab aus 0,5356 g Nucleinsäure: 0,1564 g $Mg_2P_2O_7$ (= 0,0434 g P) = 8,09 % Posphor.

b) Pankreasnucleoproteid.

1. 0,2630 g Pankreasnucleoproteid wurden in einem 800-ccm-Kjeldahlkolben zu einem Gemisch von 5 ccm Wasser und 0,5 ccm

---

[1]) Wir haben uns fast ausschließlich dieser Kjeldahlkolben bedient und sie sehr für unsere Zwecke bewährt gefunden.

[2]) Wegen der Anwesenheit des als Katalysator erforderlichen Eisensalzes kann man nicht direkt mit Magnesiamischung fällen.

rauchender Salpetersäure geschüttet. Nach Zugabe eines Krystalles von salpetersaurem Eisen wurde die Oxydation mit 70 ccm Wasserstoffsuperoxyd von 15 Gewichtsprozent ausgeführt. Hier wie in allen übrigen Fällen, wo Eiweißkörper verwendet wurden, empfiehlt es sich, zunächst nur 10 ccm des Hydroperoxyds zuzusetzen und den Verlauf der heftigen Reaktion abzuwarten, die beim Erwärmen eintritt. Dabei muß man darauf achten, daß keine festen Partikelchen an der Glaswand oberhalb der Flüssigkeitsoberfläche haften bleiben und sich der Oxydation entziehen. Man erhält schließlich eine völlig klare, schwach, kaum weingelb gefärbte Flüssigkeit, in der durch Molybdänfällung nach Zugabe von Ammonnitrat in gewohnter Weise der Phosphor bestimmt wird.

Gefunden wurden 0,0324 g $Mg_2P_2O_7$ (= 0,0090 g P) = 3,43 % Phosphor.

2. Eine Kontrolle nach dem Schmelzverfahren, die wiederum Herr Dr. Rewald ausgeführt hatte, ergab aus 0,3034 g Pankreasnucleoproteid 0,0376 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,0105 g P = 3,46 % Phosphor.

Bemerkt sei, daß das verwendete Nucleoproteid beim Trocknen 9,40 % Wasser verlor. (Der Gehalt von 3,7 % P zeigt an, daß dieses Proteid ein Gemisch von Hammarstens α-Proteid und Steudels Nuclein ist.)

c) Casein.

1. 0,5692 g Casein (Hammarsten) wurden in einen Kjeldahlkolben eingetragen, in dem sich ein Gemisch von 5 ccm Salpetersäure und 5 ccm Wasser befanden. Diese Mischung wurde unter Nachfüllen von einigen Kubikzentimetern Wasser erhitzt bis zum Eintritt der kräftigen Xanthoproteinreaktion. Dann wurde 0,1 g festes Eisennitrat und in vier Teilen 100 ccm 15 %iges Wasserstoffsuperoxyd hinzugegeben. Die Reaktion ist so zu leiten, daß sie in 20 bis 25 Minuten beendet ist. Dabei geht auch der auftretende gelbe Niederschlag ohne weiteres oder bei kurzem Erhitzen in Lösung. Durch Schütteln ist auch hier dafür zu sorgen, daß von dem anfänglich vorhandenen festen Material nichts an der Glaswandung haften bleibt. Nach Abstumpfung der sauren Reaktion durch Ammoniak und Zugabe von 5 g Ammoniumnitrat in Substanz wird in gewohnter Weise mit 50 ccm Molybdänlösung gefällt. In diesem Falle wurde das mit verdünntem

Ammoniak und Alkohol ausgewaschene Magnesiumphosphat nach der Methode von A. Hebebrand[1]) titriert. Verbraucht wurden 32,1 ccm $^{n}/_{100}$-Salzsäure (= 0,0050 g P) = 0,87 % Phosphor.

2. In einer zweiten und gleich behandelten Probe desselben Caseins wurde die Phosphorbestimmung gravimetrisch als Magnesiumphosphat ausgeführt. Erhalten wurden aus 0,2782 g Casein 0,0089 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,89 % Phosphor.

3. Die Kontrollanalyse, bei der dasselbe Casein mit Soda und Salpeter verschmolzen war, ergab für die wasserfreie Substanz einen Gehalt von 0,87 % Phosphor.

4. Wie ersichtlich, enthält das Casein außerordentlich viel Kohlenstoff (53,0 %) neben sehr wenig Phosphor (0,87 %). Man könnte deshalb daran denken, die Hauptmenge der organischen Substanz durch eine einfache Verkohlung mit konz. Schwefelsäure dem Angriff des Wasserstoffsuperoxyds leichter zugänglich zu machen, und in der Tat liefert auch dieses Verfahren gute Resultate, um so mehr, als man dann auch größere Mengen Casein bequem verarbeiten kann.

1,1155 g Casein wurden in 3 ccm konzentrierter Schwefelsäure, die sich im Kjeldahlkolben befanden, eingetragen. Man verkohlt dann vorsichtig über einer kleinen Flamme bis zur massenhaften Entwicklung von schwefliger Säure, wobei eine braunschwarze, dickflüssige Masse entsteht. Diese Operation dauert etwa 3 Minuten. Man setzt nunmehr etwa 0,2 g festes Ferrinitrat und 100 ccm 15 %iges Wasserstoffsuperoxyd in fünf Anteilen von 20 ccm hinzu. In der Regel hellt sich die Flüssigkeit bei der dritten Zugabe des Wasserstoffsuperoxyds auf und liefert zum Schluß eine vollkommen klare, schwach weingelbe Flüssigkeit. Dieselbe wird mit Ammoniak alkalisiert und mit verdünnter Salpetersäure angesäuert. Da angeblich bei Gegenwart von Sulfaten die Molybdänfällung der Phosphorsäure schwieriger ausführbar ist, wurde ein größerer Überschuß Ammoniumnitrat (12 g) und 150 ccm Molybdänlösung angewendet.

Erhalten wurden 0,0360 g $Mg_2P_2O_7$ (= 0,0100 g P) = 0,89 % P.

Wie man sieht, ist die Übereinstimmung in allen Fällen eine gute.

---

[1]) Siehe b. A. Claassen, Maßanalyse, 1912, S. 214.

d) Lecithin.

Zu den Versuchen verwendeten wir das käufliche Lecithin-Agfa. Vorversuche haben ergeben, daß die Oxydation allein mit Wasserstoffsuperoxyd einen unverhältnismäßigen Verbrauch an diesem Reagens bedingt, weil natürlich die hohen Fettsäuren des Lecithinmoleküls nur schwer zerstört werden. Deshalb empfiehlt sich auch hier die zuvor (S. 201) beschriebene Ankohlung mit konzentrierter Schwefelsäure. Das Lecithin kann trotz seiner plastischen Konsistenz bei einiger Übung in Form eines zusammenhängenden Stückes von dem zurückzuwiegenden Uhrglas in einen Kjeldahlkolben gebracht werden. Man kann dasselbe auch auf einem Streifchen Seidenpapier abwiegen und in dieses eingehüllt in das Oxydationsgefäß bringen.

0,3046 g Lecithin wurden mit 2,5 ccm konzentrierter Schwefelsäure 5 Minuten auf dem Babobleeh erhitzt, wobei schweflige Säure entweicht. Dann gibt man 5 ccm Wasser sowie 0,1 g festes Eisennitrat hinzu und oxydiert durch fünfmaligen Zusatz von je 25 ccm 15⁰/₀igen Wasserstoffsuperoxyds. Die weitere Verarbeitung erfolgt wie beim Casein (s. S. 200). Sie liefert 0,0380 g $Mg_2P_2O_7$ (= 0,0106 g P) = 3,48 % Phosphor.

Die Kontrollbestimmung in diesem Agfa-Lecithin durch Dr. Rewald nach dem Schmelzverfahren ergab einen Gehalt von 3,56 % Phosphor.

e) Glycerinphosphorsaures Calcium.

0,2936 g lösliches Calciumglycerophosphat des Handels[1]) wurden mit 5 ccm Wasser, einigen Tropfen Salpetersäure, 0,1 g Ferrinitrat und 50 ccm Wasserstoffsuperoxyd behandelt. Erhalten wurden 0,1250 g $Mg_2P_2O_7$ (= 0,0348 g P) = 11,85 % P.

Die Kontrolle (Rewald) durch Aufschluß mit Soda-Salpeterschmelze ergab für 0,1959 g Substanz 0,0848 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,0235 g P = 11,99 % Phosphor.

f) Hexosediphosphorsäureosazon.

In der nach den Angaben von v. Lebedew[2]) dargestellten Phenylhydrazinverbindung des Hexosediphosphorsäureosazons läßt sich der Phosphor leicht mit der Wasserstoffsuperoxydmethode

[1]) Nicht weiter getrocknet.

[2]) A. v. Lebedew, diese Zeitschr. 28, 215, 1910.

bestimmen, während nach v. Lebedew (l. c.) hier das Verfahren von H. Pringsheim z. B. versagt.

0,2120 g Substanz wurden mit 20 ccm siedendem Eisessig übergossen, mit 1 ccm konz. Salpetersäure versetzt und nach Zugabe von 0,1 g Ferrinitrat mit 5 mal je 20 ccm H_2O_2 oxydiert. Die Flüssigkeit wird durch Eindampfen von Eisessig befreit, mit Wasser aufgenommen, mit NH_3 alkalisiert und nach dem Ansäuern mit Salpetersäure in üblicher Weise mit Molybdänlösung usw. behandelt.

Erhalten wurden 0,0428 g $Mg_2P_2O_7$ (= 0,0119 g P) $C_{24}H_{31}N_6O_7P$: Ber P = 5,68 %; gef. P = 5,61 %.

Auch in wässerig-salpetersaurer Lösung kann die Substanz mit H_2O_2 aufgeschlossen werden. Man muß dann, wie in allen ähnlichen Fällen, bis zur klaren Auflösung erhitzen.

Auch die dem Osazon — siehe Versuch f — zugrunde liegende Hexosediphosphorsäure konnte nach unserer Methode analysiert werden.

g) Hexosediphosphorsaures Calcium.

1. 0,3510 g trockenes Calciumsalz wurden mit einigen Tropfen verdünnter Salpetersäure übergossen und bei Gegenwart von etwas Eisennitrat mit 5 mal je 25 ccm 15 %igen Wasserstoffsuperoxyds in der üblichen Weise oxydiert.

Zur Wägung gebracht wurden 0,1620 g $Mg_2P_2O_7$ (= 0,0450 g P) = 12,82 % Phosphor.

2. Eine Kontrolle nach der Methode des Schmelzens mit Soda-Salpeter ergab für das verwendete hexosediphosphorsaure Calcium einen Gehalt von 12,81 % P.

B. Schwefelbestimmungen.

Unsere Untersuchungen schwefelhaltiger Substanzen erstrecken sich auf Körper mit ganz verschiedenartig gebundenem Schwefel.

a) Thioharnstoff.

1. 0,3150 g Substanz wurden mit etwa 3 ccm Wasser, einem Tropfen rauchender Salzsäure sowie einem Kryställchen Ferrochlorür in einen Kjeldahlkolben versetzt. Die Oxydation geschah in der bei den Phosphorverbindungen beschriebenen Weise durch viermaligen Zusatz von je 20 ccm 15 %igen Wasser-

stoffsuperoxyds. Vor dem Zusatz von $BaCl_2$ wurde alsdann noch Salzsäure hinzugegeben und siedend gefällt; bei dieser Arbeitsweise haben wir in keinem Falle eine störende Verunreinigung des Bariumsulfats festgestellt.

Erhalten wurden 0,9546 g $BaSO_4$ (= 0,1311 g Schwefel) = 41,63 % S. Für CSN_2H_4 berechnet sich S = 42,10 %.

2. Eine zweite Bestimmung mit demselben lufttrockenen Material ergab folgendes: Aus 0,6894 g Substanz wurden 2,0976 g $BaSO_4$ (= 0,2880 g S) erhalten. Das entspricht 41,77 % Schwefel.

Wie ersichtlich, bietet die Analyse des Thioharnstoffes nach diesem katalytischen Verbrennungsverfahren keinerlei Schwierigkeiten, während gerade in der Literatur[1]) Angaben darüber vorliegen, daß die Bestimmung des Schwefels im Thioharnstoff Schwierigkeiten bereitet.

b) Rhodanammonium.

1. Auch das Isomere des Thioharnstoffes, das Ammoniumrhodanid, gibt bei der Behandlung mit Wasserstoffsuperoxyd in Gegenwart von Eisen seinen Schwefel als Sulfat ab.

10,0 ccm einer $^n/_{10}$-NH_4CNS-Lösung wurden mit 60 ccm des starken Wasserstoffsuperoxyds oxydiert unter Zusatz von Ferrochlorid und einer Spur Salzsäure. Das Verschwinden der Rhodaneisenreaktion zeigt zugleich das Ende der Reaktion an. Zur Wägung gebracht wurden 0,2356 g Bariumsulfat, während 0,2335 g theoretisch zu erwarten waren.

2. In einem zweiten Falle wurden 10,0 ccm derselben Rhodanammoniumlösung ebenso behandelt. Sie ergaben 0,2345 g $BaSO_4$, d. h. fast genau die theoretische Menge.

3. Auch in ammoniakalischer Lösung läßt sich, wie eingangs erwähnt, die Zersetzung durch Wasserstoffsuperoxyd durchführen. Natürlich fällt die Zugabe des Eisens dann fort. In ammoniakalischer Lösung vollzieht sich die Reaktion nicht so stürmisch wie in der sauren und erfordert etwas mehr Zeit.

Die Arbeitsweise geht aus folgenden Beispielen hervor: 10,0 ccm einer anderen n-Rhodanlösung wurden mit 20 ccm starken Ammoniaks und mit 100 ccm 15 %igen Hydroperoxyds in 4 Anteilen versetzt; die Mischung wurde im langhalsigen

---

[1]) W. Löwenstamm, Diss. Berlin 1901.

Kjeldahlkolben auf dem Wasserbade erwärmt. Wenn nach mehreren Stunden kein Wasserstoffsuperoxyd mehr vorhanden ist, wird direkt salzsauer gemacht oder zuvor ein Teil des Ammoniaks abgedampft und in üblicher Weise das Bariumsulfat gefällt. Wir erhielten 0,2338 g $BaSO_4$ statt 0,2335 g.

c) Allylsenföl.

Wie vorauszusehen war, sind auch die Alkylderivate der Rhodanwasserstoffsäure für die neue Bestimmungsmethode geeignet. Die Analyse kann in saurer und hier mit besonderem Vorteil auch in alkalischer Lösung vorgenommen werden.

1. Bestimmung in saurer Lösung. 0,3358 g Allylsenföl wurden in einen langhalsigen Kjeldahlkolben mit 50 ccm Eisessig übergossen und nach Zugabe von 1 ccm rauchender Salzsäure sowie von 0,1 g festem Ferrochlorid an einem Energierückflußkühler von 1,80 m Länge erwärmt. Durch die Glasschlange des Kühlers wurden zunächst 20 ccm des 15 $^0/_0$ igen Wasserstoffsuperoxyds zufließen gelassen. Die Reaktion muß hier wie in allen übrigen Fällen, wo flüchtige Substanzen zur Analyse gelangen, derartig geregelt werden, daß keinerlei Dampf aus dem offenen Kühlerende entweicht. Das läßt sich bei einiger Übung erreichen, wenn jedes explosionsartige Aufkochen vermieden wird und die Reaktion unter schwacher Gasentwicklung verläuft. Das Erhitzen des in einem Baboblech stehenden Kjeldahlkolbens darf zumeist nur mit der Sparflamme ausgeführt werden. Von dem ruhigen Verlauf der Reaktion hängt der Erfolg ab. Ist es zu heftigem Aufwallen gekommen, so ist der Ansatz ohne weiteres zu verwerfen.

Wenn schließlich die Gasentwicklung beendet ist, erhitzt man nach Fortnahme des Kühlers auf dem Baboblech unter Zusatz von 50 ccm 5 $^0/_0$ iger Salzsäure zu lebhaftem Sieden und fällt heiß mit Bariumchlorid. Bei kurzem Stehen auf dem Wasserbade setzt sich das Bariumsulfat aus der stark essigsauren Lösung besonders gut ab.

Erhalten wurden 0,8000 g Bariumsulfat (= 0,1098 g S) = 32,71 $^0/_0$ Schwefel. Der theoretische Gehalt des Allylsenföles an Schwefel beträgt 32,32 $^0/_0$ S.

2. Bei den Senfölen ist man in der Lage, die flüchtige Verbindung sehr leicht in eine nichtflüchtige umzuwandeln,

nämlich durch Behandlung mit Ammoniak, wobei ein Thioharnstoff entsteht. Der Schwefel der letzteren kann dann in der ammoniakalischen Lösung ohne weiteres durch Wasserstoffsuperoxyd in Sulfat übergeführt werden.

0,2164 g Allylsenföl wurden im Kjeldahlkolben mit 10 ccm konzentriertem Ammoniak versetzt und nach einigem Stehen mit 40 ccm Wasser verdünnt. Durch 4 maligen Zusatz von je 25 ccm des starken Wasserstoffsuperoxyds wurde alsdann die Umwandlung in Sulfat vollzogen. Zur Wägung kamen 0,5085 g Bariumsulfat (= 0,0697 g Schwefel) = 32,24 % S.

d) Chondroitinschwefelsaures Natrium.

Theoretisch ist bei den Ätherschwefelsäuren durch einfache Zerlegung die Schwefelsäure abspaltbar. In Wirklichkeit wird jedoch bei den hochmolekularen Gliedern dieser Körpergruppe während der zur Hydrolyse erforderlichen Zeit so viel kohlenstoffhaltiges Material unlöslich abgeschieden, daß in der Regel eine Veraschung erforderlich ist. Bei diesen Verbindungen bietet die katalytische Verbrennung mit Wasserstoffsuperoxyd ebenfalls Vorteile, indem sie eine sehr viel schnellere Loslösung der Schwefelsäure ermöglicht als die einfache Säurenhydrolyse.

0,5894 g chondroitinschwefelsaures Natrium wurden in 10 ccm heißes Wasser eingetragen und mit 1 ccm rauchender Salzsäure sowie einer Spur Ferrochlorid versetzt. Die Oxydation geschah mit 100 ccm Wasserstoffsuperoxyd, das in 5 Anteilen zugesetzt wurde. Aus der völlig klaren Flüssigkeit wurde nach Zugabe von Salzsäure das Bariumsulfat in üblicher Weise gefällt. Erhalten wurden 0,2242 g $BaSO_4$ (= 0,0308 g Schwefel) = 5,22 % S.

2. Die Kontrolle geschah durch Soda-Salpeterschmelze und ergab 5,23 % S in dem gleichen Präparat.

e) Cholesterinschwefelsaures Kalium.

Für die Cholesterinschwefelsäure[1]) liegen die Verhältnisse ähnlich wie für die Chondroitinschwefelsäure. Wir paßten hier die Methode der Natur der Substanz in folgender Weise an.

0,5534 g cholesterinschwefelsaures Kalium wurden in 30 ccm Eisessig heiß gelöst und nach Zugabe von einem Kryställchen

[1]) Siehe J. A. Mandel und C. Neuberg, diese Zeitschr. 71, 186, 1915.

Eisenchlorür mit 100 ccm 15 %igen Wasserstoffsuperoxyds oxydiert, anfangs auf freier Flamme, später auf dem Wasserbade. Durch Fällung mit Bariumchlorid wurden erhalten 0,2636 g $BaSO_4$ (= 0,0362 g Schwefel) = 6,54 % S.

Theoretisch enthält die Verbindung 6,35 % S[1]).

f) Casein.

Ähnlich wie der Phosphor läßt sich im Casein der Schwefel ermitteln, und zwar können beide Metalloide in einer Substanzprobe ermittelt werden.

Wir verfuhren hierbei folgendermaßen: 1,0050 g wasserfreies Casein nach Hammarsten wurden unter Erwärmung in 3 ccm rauchender Salpetersäure gelöst. Nach Zugabe von 5 ccm Wasser und etwas festem Eisennitrat wurde in der auf Seite 200 beschriebenen Weise mit 100 ccm Wasserstoffsuperoxyd oxydiert.

α) Zur Bestimmung des Schwefels wurde die siedende Lösung mit 10 %igem Bariumacetat gefällt. Erhalten wurden 0,0602 g $BaSO_4$ (= 0,0082 g Schwefel) = 0,81 % S.

β) Im Filtrat der Bariumacetatfällung wurde ohne weiteres die Phosphorsäure mit Molybdänlösung niedergeschlagen. Die Weiterverarbeitung lieferte 0,0300 g $Mg_2P_2O_7$ (= 0,0083 g P) = 0,826 % P.

Die besten in der Literatur vorhandenen Analysen für Casein gaben einen Schwefelgehalt von 0,76 bis 0,82 und einen Phosphorgehalt von 0,85 % an. Wie man sieht, liefert unsere schnell ausführbare Methode hier recht scharfe Werte.

g) Thiosulfat.

1. Auch in einer anorganischen Schwefelverbindung, dem Thiosulfat, konnten wir nach dem katalytischen Oxydationsverfahren quantitativ den gesamten Schwefel als Schwefelsäure bestimmen. Wir gingen aus von $^n/_{10}$-Thiosulfat. 10,0 ccm wurden zunächst mit 50 ccm Wasserstoffsuperoxyd von 15 %, dann mit einer Spur Eisenchlorür und mit 1 ccm Salzsäure versetzt. Der Vorsicht wegen wählt man die angegebene Reihenfolge. Sie verhindert eine vorherige anderweitige Zerlegung des Thiosulfats. Denn nach Willstätter[2]) wird neutrales Thio-

---

[1]) Siehe J. A. Mandel und C. Neuberg, diese Zeitschr. 71, 190, 1915.

[2]) R. Willstätter, Ber. 36, 1831, 1903.

sulfat in der Kälte durch Wasserstoffsuperoxyd (ohne Gegenwart von Eisen) im Sinne der Gleichung

$$2\ Na_2S_2O_3 + 4\ H_2O_2 = 4\ H_2O + Na_2S_3O_6 + Na_2SO_4$$

unter Bildung von Trithionat verändert. Zur Vervollständigung der Oxydation, zu deren Anfang vorübergehend eine schmutzig weinrote, dann bräunliche Färbung auftritt, wurde nochmals das gleiche Quantum Wasserstoffsuperoxyd hinzugegeben. Erhalten wurden 0,4619 g Bariumsulfat statt 0,4660 g.

2. Auch die Oxydation des Thiosulfats in ammoniakalischer Lösung gelingt.

10,0 ccm $^n/_{10}$-$Na_2S_2O_3$-Lösung wurden mit 10 ccm 25 % NH_3 und im ganzen mit 100 ccm H_2O_2 von 15 % auf dem Wasserbade etwa 1 Stunde erhitzt.

Gefunden 0,4641 g $BaSO_4$.

Wir wollen nicht unerwähnt lassen, daß wir bei folgenden schwefelhaltigen Körpern auch Mißerfolge oder nur einen teilweisen Erfolg bei Anwendung des neuen Verfahrens zu verzeichnen haben. So bleibt die Abspaltung des Schwefels aus Taurin auch bei Anwendung größerer Mengen Wasserstoffsuperoxyds nur unvollständig. Beim Thiophen scheitert die direkte Bestimmung des Schwefels daran, daß ein Teil (ca. $^1/_3$) gasförmig in Form von Schwefelwasserstoff entweicht, während $^2/_3$ bei der Oxydation in Eisessiglösung in Form von Schwefelsäure erhalten werden. Man kann zwar den bei der Thiophenoxydation entweichenden Schwefelwasserstoff nach einer der bekannten Methoden zu Schwefelsäure oxydieren und erhält ganz befriedigende Resultate; allerdings wird das Verfahren dann so kompliziert, daß es kaum noch Vorteile vor einer Bestimmung nach Carius bietet.

C. Halogenbestimmungen.

Bei der Analyse der Halogenverbindungen muß man etwas anders zu Werke gehen. Es ist erforderlich, zur Bindung des freigemachten Halogens von vornherein Silbernitrat hinzuzugeben. Falls die Verbindungen flüchtig sind, so sind dieselben Vorsichtsmaßregeln wie beim Allylsenföl (s. S. 205) auf das peinlichste zu beachten. Der Gang der Analyse ergibt sich aus folgendem Beispiel.

a) Amylbromid.

0,2480 g Amylbromid wurden in einem Wägegläschen mit 30 ccm Eisessig gemischt. Die Lösung wurde in den langhalsigen Kjeldahlkolben überführt und das Wägegläschen 3 mal mit 5 ccm Eisessig ausgewaschen. In den Kjeldahlkolben wurde gleichzeitig ein Krystall von festem Eisennitrat sowie 1 g festes Silbernitrat nebst 1 ccm konzentrierter Salpetersäure eingebracht. Der Kolben wurde alsdann mit dem langen Energierückflußkühler verbunden und durch dessen offenes Ende erstmalig 20 ccm Wasserstoffsuperoxyd eingeführt. Bei vorsichtigem Erwärmen auf dem Baboblech mittels Sparflamme wird die Reaktion allmählich eingeleitet. Es scheidet sich sehr bald Bromsilber ab, doch ist zur Vervollständigung der Reaktion noch eine 4 malige Zugabe von je 20 ccm Wasserstoffsuperoxyd erforderlich. Die Erwärmung ist so zu leiten, daß die Reaktion in etwa 6 Stunden beendet ist. Während derselben entweicht aus dem Kühler ein Dampf, der nach Amylalkohol, aber nicht nach Bromamyl riecht.

Die Bestimmung des Bromsilbers erfolgte im Quarz-Goochtiegel und lieferte 0,3064 g AgBr (= 0,1304 g Brom) = 52,61 $^0/_0$ Br. Theoretisch berechnet sich Br = 52,98 $^0/_0$.

b) Äthylenbromid.

Die Verarbeitung geschah genau wie bei Amylbromid. 0,1986 g lieferten bei der Oxydation mit 100 ccm Wasserstoffsuperoxyd in eisessigsaurer Lösung in Gegenwart von salpetersaurem Eisen und überschüssigem Silbernitrat (2 g festem $AgNO_3$): 0,3948 g AgBr (= 0,0168 g Brom) = 84,95 $^0/_0$ Br.

Berechnet für $C_2H_4Br_2$: Br = 85,11 $^0/_0$.

Zu bemerken ist, daß während der Oxydation ein acetylenartig riechendes Gas entwich, und daß das ausgeschiedene Bromsilber zunächst schwärzlich verfärbt war. Es wurde deshalb vor dem Sammeln im Goochtiegel auf dem Wasserbade mit Salpetersäure digeriert.

Sowohl bei Äthylenbromid wie bei Amylbromid empfiehlt es sich, den Druck in der Apparatur zu erhöhen. Zu diesem Zweck verbindet man das offene Ende des aufwärts gerichteten Kühlers nach jedesmaliger Zugabe des Wasserstoffsuperoxyds mit einem absteigenden Glasrohr, das in eine Quecksilbersäule von etwa 100 ccm Höhe eintaucht.

c) Jodbenzol.

Ganz entsprechend kann die Halogenbestimmung im Jodbenzol ausgeführt werden.

0,3670 g Jodbenzol lieferten 0,4220 g AgJ (= 0,2281 g J) = 62,15 % J.

Für C_6H_5J berechnet sich J = 62,26 %.

d) p-Jodacetanilid.

Die feste Substanz wurde auch hier in Eisessig gelöst und sonst wie bei den übrigen Halogenverbindungen behandelt. Das Jod wurde hier titrimetrisch nach Verdünnung der essigsauren Lösung mit Wasser bestimmt. Selbstverständlich ist es wegen der Titration mit Rhodan erforderlich, daß alles Wasserstoffsuperoxyd verbraucht ist, da wie vorher (siehe S. 204) beschrieben, Rhodanide von Hydroperoxyd zerstört werden.

Die Ausführung der Bestimmungen gestaltet sich folgendermaßen:

0,2479 g Jodacetanilid wurden mit 25 ccm heißem Eisessig gelöst, mit 20 ccm $^n/_{10}$-Silbernitratlösung, einigen Tropfen Salpetersäure sowie einem Krystall Eisennitrat versetzt. Bei gelindem Erwärmen vollzog sich bei der Oxydation mit 100 ccm Wasserstoffsuperoxyd alsbald die Abscheidung von Jodsilber. Nach weiterer einstündiger Erwärmung auf dem Wasserbade wurde nach Zugabe von Wasser und etwas Ferriammonsulfat in bekannter Weise der Silberüberschuß zurücktitriert.

Zur Jodbindung waren verbraucht 9,6 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$-Lösung (= 0,12197 g Jod) = 49,19 % J.

Für C_8H_8NOJ berechnet sich: J = 48,66 %.

e) Dijodtyrosin.

3,5-Dijodtyrosin, das wir nach den Angaben von Oswald[1]) darstellten und das den von diesem Autor angegebenen Schmelzpunkt 204° bis 205° besaß, wurde in wässeriger Lösung oxydiert. 0,2011 g Dijodtyrosin wurden mit 20 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$, einigen Tropfen Salpetersäure und etwas festem Eisennitrat im Kjeldahlkolben erwärmt. Die Oxydation mit 100 ccm Wasserstoffsuperoxyd vollzog sich außerordentlich schnell. Nach völliger Zerstörung des H_2O_2, die man hier wie in allen Fällen durch Einhängen eines Platindrahtes in die Lösung nach Schluß

[1]) Ad. Oswald, Zeitschr. f. physiol. Chem. **59**, 321, 1909.

der Oxydation beschleunigen kann, wurde abgekühlt und titriert. Verbraucht waren 9,35 ccm $^{n}/_{10}$-$AgNO_3$ = 0,1187 g Jod = 58,81 % J. Berechnet für $C_9H_9O_3J_2N$: J = 58,66 %.

D. Arsenbestimmung.

1. Auch bei einer Arsenverbindung haben wir das Verfahren in einem Falle bewährt gefunden. Das Arsen liegt bei der energischen Oxydationsverbindung zum Schlusse als Arsensäure vor.

0,5108 g Kakodylsäure, die nach der titrimetrischen Bestimmung 99,45 %ig war, wurden unter Zusatz von Eisennitrat und einigen Tropfen Salpetersäure im Kjeldahlkolben mit 120 ccm Wasserstoffsuperoxyd von 15 % oxydiert. Nach Zugabe von reichlich Ammoniumnitrat wird die Arsensäure mit Molybdänlösung in der Wärme gefällt. Die Überführung in Magnesiumarseniat ergab 0,5805 g $Mg_2As_2O_7$ (= 0,2803 g As) = 54,88 % As.

Für $C_2H_7AsO_2$ berechnet sich Arsen = 54,35 %.

2. Eine Arsenbestimmung in derselben Kakodylsäure durch Soda-Salpeterschmelze, die Dr. Rewald ausführte, ergab aus 0,7154 g Substanz 0,8004 g $Mg_2As_2O_7$ = 54,12 % Arsen.

Anwendung der katalytischen Verbrennung in der qualitativen Analyse.

Seit einem Jahre haben wir das Verfahren der Oxydation mit Wasserstoffsuperoxyd und Eisen zum qualitativen Nachweis von Metalloiden[1]) in allen möglichen organischen Verbindungen[2]) benutzt und bisher keinen Mißerfolg zu verzeichnen gehabt.

Die qualitative Prüfung kann mit sehr geringen Substanzmengen ausgeführt werden, und gibt mit Milligrammen und oft mit Zehntel-Milligrammen noch außerordentlich deutliche Ausschläge. Wer sich an die Probe gewöhnt hat, wird sie in der Laboratoriumspraxis nicht mehr missen mögen. In kürzester Zeit geben folgende Substanzen positive Reaktion:

a) Phosphorsäurenachweis: Elementarer Phosphor, Triphenylphosphin, Triphenylphosphat, Nucleinsäuren, Casein.

---

[1]) Und auch in metallorganischen Verbindungen, worüber gelegentlich berichtet werden wird.

[2]) Vgl. die vielfachen Angaben von Jannasch über die Verwendung des Wasserstoffsuperoxydes für die Analyse anorganischer Verbindungen.

b) Arsennachweis: Benzolarsinsäure, Atoxyl, Kakodylate, Methyldinatriumarsenat, Dioxy-diamino-arsenobenzol (Salvarsan).

c) Schwefelnachweis: Thioharnstoff, phenolsulfosaures Natrium, benzolsulfosaures Natrium, Äthyldisulfid, Thioessigsäure, Thioglykolsäure, α-Oxythionaphtencarbonsäure, Cibaviolet, Trimethylsulfinjodid[1]), Schwefelkohlenstoff, Schwefelblumen.

d) Halogennachweis: Dichlorhydrin, Jodhydrin (Jodthion), 6-Chlorsalicylsäure, Triacetyl-dibromgallussäuremethylester, Jodostearin, Jodosobenzoesäure, Dichloranilin, m-Brombenzoesäure, Jodbenzol, Amylbromid, Acetylendichlorid, Chloroform, β-Jodpropionsäureester.

e) Selennachweis: Selencyankali wird in ammoniakalischer Lösung zu Selensäure oxydiert, ebenso gewisse aromatische Selenverbindungen in saurer Lösung. Rotes Selen und gefälltes Tellur gehen in Eisessiglösung in Selensäure bzw. Tellursäure über.

Die qualitativen Reaktionen führen wir folgendermaßen aus:

Die in Wasser oder in verdünnten Säuren löslichen Verbindungen werden in einem weiten und langen Reagensglase in 0,5 bis 1,0 ccm Lösungsmittel gelöst und nach Zugabe einer Spur Eisensalz mit etwa 1 ccm 50%iger Wasserstoffsuperoxydlösung erwärmt. Nach Ablauf der heftigen Reaktionen können Phosphorsäure und Arsensäure in der üblichen Weise mit Molybdänlösung nachgewiesen werden. Schwefelsäure kann durch Bariumchlorid erkannt werden. Bei den Prüfungen auf Phosphor und Arsen verwendet man am besten Eisennitrat. Für die Erkennung der Schwefelsäure ist Eisenchlorür vorzuziehen. Beim Nachweise der Halogene ist es notwendig, einige Tropfen Silbernitrat zu der salpetersauren Lösung von vornherein zuzufügen und als Katalysator Eisensulfat oder -nitrat zu verwenden. Vielfach treten vorübergehend Färbungen auf; man erwärmt bis zur Aufhellung. Wird die Reaktion zu stürmisch, so kann sie durch Kühlen mit Wasser gemäßigt werden.

Handelt es sich um Verbindungen, die in Wasser unlöslich sind, so empfehlen wir, die Substanzprobe in etwa 1 bis 2 ccm Eisessig zu lösen und sonst wie zuvor zu verfahren. Unlösliche Substanzen gehen vielfach auch im Verlaufe der Reaktion in Lösung.

[1]) Nur in salpetersaurer Lösung.

In manchen Fällen können an Stelle des Wasserstoffsuperoxyds auch Verbindungen desselben, z. B. das Harnstoff-Wasserstoffsuperoxyd, Verwendung finden. Mit den Salzen der sogenannten Persäuren, wie mit Ammoniumpersulfat, Natriumperborat, Kaliumpercarbonat, kann ähnliches erreicht werden. Allein diese Verbindungen sind in der Regel viel unreiner als das Wasserstoffsuperoxyd selbst und auch nicht wesentlich billiger. Sie bieten überdies den Nachteil, daß eine Reihe fremder Elemente mit dem Oxydationsmittel eingeführt werden würde.

Übersicht.

1. Starkes Wasserstoffsuperoxyd (15-gewichtsprozentiges von E. Merck in Darmstadt) vermag in Gegenwart von Eisensalz (Ferrinitrat, Ferrosulfat oder -chlorid) organische Verbindungen derartig katalytisch zu verbrennen, daß in ihnen enthaltene Metalloide frei werden. Die Reaktion verläuft beim Erwärmen in wenigen Augenblicken in solchem Umfange, daß der qualitative Nachweis sehr allgemein auf diesem Wege erbracht werden kann. Verbindungen, die in Wasser oder verdünnten Säuren unlöslich sind, werden zweckmäßig in Eisessig gelöst oder suspendiert.

2. Die quantitative Bestimmung der in organischer Bindung vorhandenen Metalloide läßt sich in vielen Fällen mit dem gleichen Verfahren ausführen. Die Methode soll keineswegs für alle Fälle empfohlen werden, sondern es ist erforderlich, ihre spezielle Anwendbarkeit durch einen Vorversuch festzustellen. Ist das Verfahren aber brauchbar, so zeichnet es sich durch große Sauberkeit und schnelle Ausführbarkeit aus. In der Regel sind die nicht flüchtigen Verbindungen leichter zu handhaben, doch können mit genügender Vorsicht auch flüchtige Verbindungen analysiert werden. Substanzen, die in Wasser oder verdünnten Säuren unlöslich sind, können auch in alkalischer, am besten in ammoniakalischer Lösung durch das Wasserstoffsuperoxyd derartig oxydiert werden, daß das in ihnen enthaltene Metalloid in die höchste Oxydationsstufe übergeführt wird. Verbindungen, die in wässerigen Solventien unlöslich sind, können in eisessigsaurer Lösung zur Analyse gelangen.

Über einen einfachen Nachweis von kleinen Mengen Glycerin sowie von Alkoholen und Säuren der Kohlenhydratreihe.

Von

Joh. A. Mandel[1]) und Carl Neuberg.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Der Nachweis kleiner Mengen Glycerin[2]) ist bisher mit großen Schwierigkeiten verknüpft gewesen.

Die Acroleinprobe leidet an dem Nachteil, daß zahlreiche andere organische Stoffe ähnlich riechende empyrheumatische Produkte entwickeln, ganz abgesehen von dem Umstande, daß nur konzentriertes bzw. wasserfreies Glycerin mit Bisulfat oder Borsäure unter Wasserabspaltung reagiert. Das Lösungsvermögen für Kupferhydroxyd teilt das Glycerin gleichfalls mit vielen Verbindungen. Die Oxydierbarkeit durch Bichromat sowie die Reduktion durch Jodwasserstoff zu Isopropyljodid, die nur quantitative Bestimmung reiner Lösungen gestatten, sind zum Zwecke der Erkennung nicht brauchbar. Auch die Grünfärbung der Bunsenflamme, die eine mit Glycerin getränkte Boraxperle hervorbringt, ist nicht charakteristisch, da andere Borsäureester sich ebenso verhalten. Die von Denigès vorgeschlagenen Farbenreaktionen erfordern längere Zeit zur Ausführung.

Sehr schnell läßt sich nun ein sicherer Nachweis des Glycerins durch folgende Reaktion erbringen.

Eine etwas Lauge enthaltende n-NaOCl-Lösung, bereitet nach der sorgfältigen Vorschrift von Raschig[3]), oxydiert in

---

[1]) Gast des Kaiser Wilhelm-Instituts.

[2]) Lit. s. bei C. Neuberg, Der Harn, 206—212.

[3]) F. Raschig, Ber. **40**, 4586, 1907.

der Siedehitze eine verdünnte wässerige Glycerinlösung fast augenblicklich zu Glycerose. Das Reduktionsvermögen der letzteren kann, wie schon früher angegeben[1]), zu einem guten Nachweise des Glycerins dienen. Viel schärfer aber wird der Nachweis, der sich auf den positiven Ausfall der Orcinreaktion gründet. Diese tritt mit beiden Bestandteilen der Glycerose, dem Glycerinaldehyd sowie dem Dioxyaceton, ein[2]).

2 ccm einer 1%igen oder 1‰igen wässerigen Glycerinlösung sind durch die Orcinreaktion nach voraufgegangener Behandlung mit Natriumhypochlorit in aller Schärfe nachzuweisen. Die Wirkung des Hypochlorits ist natürlich im Grunde keine andere als die des von E. Fischer und J. Tafel[3]) vor beinahe 30 Jahren benutzten Oxydationsgemisches Soda plus Bromwasser. Dementsprechend kann man auch eine Natriumhypobromitlösung verwenden, die analog Raschigs Vorschrift bereitet ist, sowie einen guten Chlorkalk. Diese zwei Mittel bieten jedoch keinen Vorteil, da allem Anscheine nach NaOCl schneller mit Glycerinlösung reagiert und reinere Nuancen bei der Farbenreaktion erzeugt.

Die Beweiskraft der Probe ist in praxi eine vollständige. Zwar ist die Orcinreaktion der Glycerose der bekannten Orcinprobe der Pentosen und der Glucuronsäure sehr ähnlich. Von präformierten Substanzen dieser Reihe kann Glycerin leicht durch das Fehlen des Reduktionsvermögens gegen Fehlingsche Mischung unterschieden werden; erst nach der Hypochloritoxydation reduziert Glycerin. Im übrigen können begleitender Zucker durch vorsichtiges Eindampfen mit Kalk oder Barytwasser und nachherige Ausfällung mit Alkohol-Äther entfernt werden. Ganz ebenso kann man Säuren der Kohlenhydratreihe entfernen, die z. T. (s. unten) ebenfalls durch Hypochlorit zu Substanzen oxydiert werden können, die positiv mit Orcin reagieren.

Es bleibt nur die Möglichkeit einer Verwechslung des Glycerins mit Äthylenglykol und seinen Homologen, d. h. mit Tetriten, Pentiten, Hexiten und Heptiten. Von diesen liefern die

---

[1]) C. Neuberg, Der Harn, 207.

[2]) C. Neuberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**, 564, 1900; Diese Zeitschr. **71**, 150, 1915.

[3]) E. Fischer und J. Tafel, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 20, 3384, 1887.

Alkohole der 4-, 5- und 7-Kohlenstoffreihe bei der Oxydation die entsprechenden Zucker[1]), die eine Orcinreaktion geben. Bei den Hexiten liegen die Verhältnisse derart, daß zwar ihre direkten Oxydationsprodukte, die Hexosen, an sich nicht mit Orcin typisch in Umsetzung treten, daß sie aber leicht durch NaOCl weiter oxydiert werden offenbar zu Substanzen, die in die Reihe der Pentosen oder ihrer Carbonsäuren gehören. Dementsprechend reagiert z. B. auch Traubenzucker und schwächer die Fructose nach Kochen mit NaOCl orcinpositiv.

Von den meisten seiner Homologen kann Glycerin schon durch die sehr viel größere Löslichkeit in Äther getrennt werden. Hierzu kommt, daß die höheren mehrwertigen Alkohole leicht krystallisieren und wohl selten in der Natur gerade das Glycerin begleiten. Das gleiche gilt vom Äthylenglykol, das in einigen seltenen Phosphatiden angetroffen wird; bei der Oxydation mit Hypochlorit geht es in eine Substanz über, die mit Orcin-Salzsäure zwar unter Grünfärbung reagiert, aber ohne Bildung eines beständigen und charakteristischen Absorptionsstreifens im Amylalkoholauszug. Stellt man nämlich die Reaktion unter den Bedingungen, wo Glycerin optimal reagiert, mit Äthylenglykol an, so bleibt sie aus, da diese Hypochloritmenge schon eine Überoxydation bedingt.

Unter diesen Umständen ermöglicht die Hypochlorit-Orcinreaktion einen recht sicheren

Nachweis des Glycerins.

Man verfährt folgendermaßen:

2 bis 3 ccm einer 1 %igen oder 1 ‰igen Lösung von Glycerin in Wasser werden mit genau 3 Tropfen (= 0,12 ccm) n-NaOCl versetzt und eine Minute gekocht. Dann fügt man abermals 3 Tropfen n-NaOCl hinzu und läßt wiederum eine Minute lang sieden. Zu der noch heißen Flüssigkeit gibt man 3 Tropfen gewöhnliche Salzsäure (D = 1,124) und kocht 30 bis 60 Sekunden zur Zerstörung event. noch vorhandenen Hypochlorits bzw. zur Austreibung des Halogens, wobei eine völlig farblose Flüssigkeit entstehen muß. Dann versetzt man mit der gleichen Menge rauchender Salzsäure und einer kleinen Messerspitze

[1]) C. Neuberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 564, 1900; J. Wohlgemuth, ebendas 35, 568, 1902; G. Bertrand, Ch. C. 1909, II, 188.

Orcin[1]). Beim Kochen färbt sich die Mischung schön violett oder grünblau[2]). Sie zeigt direkt einen Absorptionsstreifen, der meist sehr viel deutlicher nach Ausschüttelung mit reinem Amylalkohol zutage tritt, wobei eine eingetretene Ausscheidung sich löst. Der Absorptionsstreifen liegt im Gelb, der Amylalkoholauszug ist bei richtiger Ausführung schön blaugrün gefärbt. Es kommen auch gelbbraune Nuancen vor; beweisend ist nur der typische Streifen.

Ganz analog dem Glycerin verhält sich gebundenes Glycerin, das wir in Form von

glycerinphosphorsaurem Calcium

geprüft haben. Die 1- und 0,1 %ige Lösung des Salzes gibt nach Hypochloritbehandlung (2 × je 3 Tropfen) eine prächtige Reaktion mit Salzsäure und Orcin.

Wie zuvor erwähnt, reagieren die

Homologen des Glycerins sowie deren Carbonsäuren

zum Teil ebenso oder wenigstens ähnlich mit Hypochlorit-Orcin.

In 1 %iger Lösung geben folgende Alkohole bei gleicher Behandlung mit Hypochlorit eine reduzierende Lösung und mit Orcin eine positive Farbprobe:

Erythrit,
Adonit,
l-Arabit,
d-Mannit,
d-Sorbit,
Dulcit.

Dagegen liefert Äthylenglykol[3]) nur bei Oxydation seiner 1 %igen Lösung mit 3 Tropfen Hypochlorit eine Lösung, die sich mit Orcin in salzsaurer Lösung färbt. 6 Tropfen oxydieren — wie bereits erwähnt — zu orcinnegativen Körpern.

---

[1]) Diese Reihenfolge des Reagentienzusatzes ist in der Regel die empfehlenswerteste. Ein großer Orcinüberschuß ist zu vermeiden, da er offenbar zu atypischen Kondensationsprodukten führt.

[2]) Sind noch Chlorspuren zugegen, so tritt eine bräunliche Mißfärbung ein.

[3]) Cholin und Aminoäthylalkohol, die Derivate des Äthylenglykols sind, reagieren nicht in dieser Weise.

Kräftig positiv reagieren die

Hexonsäuren,

die in Form der Salze oder in freiem Zustande verwendet werden können; offenbar findet ein Abbau zu Pentosen statt. Wir prüften mit positivem Erfolge die 1- und 0,1 %igen Lösungen von

d-gluconsaurem Calcium,
d-Mannonsäurelacton,
d-galaktonsaurem Cadmium.

Ihnen schließt sich völlig an die

d-Glucosaminsäure,

die so sehr einfach erkannt werden kann.

Von den Hexosen reagieren nach Hypochloritbehandlung

d-Glucose,
d-Mannose und
d-Galaktose

positiv; ebenso verhält sich d-Glucosamin-chlorhydrat. Die Färbung des Amylalkoholauszugs ist manchmal mehr olivbraun, doch ist ein typischer Absorptionsstreifen wahrnehmbar, wahrscheinlich herrührend von Abbauprodukten der Zucker.

Zur Biochemie der Strahlenwirkungen. IV.

Photochemische Bildung von Indigo aus Indican.

Von

Carl Neuberg und Erwin Schwenk.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Im Jahre 1908 hat P. Friedlaender[1]) die bemerkenswerte Feststellung gemacht, daß der antike Purpur ein einfacher Abkömmling des gewöhnlichen Indigblaus, und zwar das 6,6'-Dibromindigotin ist.

Dieser Farbstoff ist in der Drüse der Purpurschnecken in Form einer farblosen und nach Friedlaender leicht löslichen Vorstufe enthalten; er wird aus dieser erst durch Belichtung entwickelt. Als lösliche Vorstufen des Indigos kommen nun vornehmlich die Körper der Indoxylreihe in Betracht, und tatsächlich sind bisher drei natürliche Vertreter dieser Körperklasse bekannt geworden: Indoxylschwefelsäure und Indoxylglucuronsäure, die sich im tierischen Urin finden, (Harnindican), sowie das Pflanzenindican, das höchstwahrscheinlich als Indoxylglucosid anzusprechen ist.

Halogenhaltige Indoxylderivate sind bisher weder im Tiernoch Pflanzenreich aufgefunden worden; allein die wahrscheinliche Muttersubstanz aller dieser Indigoderivate, das Tryptophan, ist bereits durch die besondere Leichtigkeit ausgezeichnet, mit der es Halogen, namentlich auch Brom, unter Bildung rotblau gefärbter Substanzen[2]) aufnimmt.

Es war somit von Interesse, zu sehen, ob ein einfaches,

---

[1]) P. Friedlaender, Monatshefte 28, 991, 1908; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 42, 765, 1909.

[2]) Über die reinen Halogenderivate der Indylaminopropionsäure siehe C. Neuberg und N. Popowski, diese Zeitschr. 2, 357, 1906; 24, 441, 1910.

natürlich vorkommendes Indoxylderivat zur photochemischen Bildung von Indigo befähigt ist.

Wir wählten zu diesen Versuchen die Indoxylschwefelsäure, die jetzt nach dem Verfahren von A. Jolles und E. Schwenk[1]) leicht zugänglich geworden ist. Die nunmehr ganz rein vorliegende Verbindung ist sehr viel beständiger, als man allgemein annimmt, und nach unseren Erfahrungen sehr gut für den gedachten Zweck geeignet.

In einer Reihe früherer Arbeiten hat der eine von uns gezeigt, daß Spuren von Metallverbindungen, wie Eisen-, Uran- und Mangansalzen u. a., mächtige Lichtkatalysatoren darstellen[2]). Insbesondere vollziehen sich Hydrolysen und Oxydationen mit großer Schnelligkeit im Licht bei Gegenwart einer kleinen Menge der erwähnten Katalysatoren. Auch bestimmte organische Substanzen, die mit den genannten Metallsalzen die Eigenschaft teilen, in verschiedenen Oxydationsstufen (Chinon $\rightleftarrows$ Hydrochinonform) aufzutreten[3]), sind außerordentlich schnell wirkende Überträger der Lichtenergie.

In Gegenwart von Spuren all der genannten Katalysatoren gelingt es nun mit überraschender Leichtigkeit und Schnelligkeit, bei Bestrahlung mit natürlichem oder künstlichem Licht aus Indican Indigo zu erzeugen, während das indoxylschwefelsaure Kalium unter sonst gleichen Bedingungen im Dunkeln völlig unverändert bleibt. In der belichteten Probe spaltet sich Schwefelsäure ab, und zugleich wird das wohl zunächst gebildete Indoxyl zu Indigo oxydiert. Diesem Indigblau sind anscheinend Spuren eines rötlichen, an Indirubin erinnernden Farbstoffes beigemengt; letzterer tritt bekanntlich fast bei allen Indigobildungen als Nebenprodukt auf. Somit entsteht Indigo photochemisch aus einer farblosen Vorstufe der C_8-Reihe, ein Vorgang, der mit der Entwicklung des natürlichen Purpurs in der belichteten Schnecke weitgehende Ähnlichkeit aufweist.

---

[1]) A. Jolles und E. Schwenk, diese Zeitschr. 68, 347, 1915.

[2]) Siehe bei C. Neuberg, Beziehungen des Lebens zum Licht. Monogr. Berlin 1913.

[3]) Siehe hierzu: C. Neuberg und A. Galambos, diese Zeitschr. 61, 315, 1914; C. Neuberg und W. H. Peterson, ebenda 67, 63, 1914.

Experimenteller Teil.

Wir verwendeten 0,75 %ige Lösungen von reinstem indoxylschwefelsauren Kalium, die in kleinen, möglichst gleichen Reagensgläsern aus Quarz bzw. aus gewöhnlichem Glas in etwa 25 cm Entfernung von einer Quecksilberlampe[1]) aufgestellt wurden. Eine Erwärmung kommt dabei nicht in Betracht, und überdies zeigen die im direkten Sonnenlicht an kalten klaren Wintertagen (Temperatur in der Sonne nicht über + 10°) vorgenommenen Versuche, daß die Wärmestrahlung keine Rolle spielt und daß das Licht der Sonne ebenso wirkt wie das der Quecksilberlampe. Nach erfolgter Bestrahlung wurde der Röhreninhalt in einen Schütteltrichter übergespült; die Reagensgläser wurden mit Chloroform mehrmals ausgekocht und die im Schütteltrichter befindliche Lösung zuerst mit diesem und dann mit frischem Chloroform bis zur Erschöpfung an Farbstoff ausgeschüttelt. Die Extrakte wurden in ein kleines Titrierkölbchen abgelassen, und auf dem Wasserbade das Chloroform abgedampft. Der Rückstand wurde mit 10 ccm konzentrierter Schwefelsäure etwa 5 Minuten lang erwärmt, und die so erhaltene Lösung von Indigoschwefelsäure wurde alsdann nach dem für die Harnindicanbestimmung angegegebenen Verfahren von Ellinger[2]) mit auf reines Indigotin eingestellter Permanganatlösung titriert. 1 ccm unserer Lösung entsprach 0,0002538 g Indigo.

Versuch 1.

Katalysator: 0,2 bis 1 ccm einer 1 %igen Lösuug von Ferrosulfat.

Bestrahlungsdauer: $3^1/_2$ Stunden.

Gefäß: Quarzröhrchen[3]).

Verwendete Menge: 10 ccm 0,75 %ige Lösung von indoxylschwefelsaurem Kalium.

---

[1]) Zu den Versuchen diente die „Künstliche Höhensonne" der Quarzlampengesellschaft.

[2]) A. Ellinger, Zeitschr. f. physiol. Chem. 38, 178, 1903.

[3]) Versuch 1 zeigt, daß bei Verwendung von Quarzgefäßen auch die rein wäßrige Lösung von indoxylschwefelsaurem Kalium verändert wird. Das ist bei Benützung von Glasröhren innerhalb unsrer Bestrahlungszeiten nicht der Fall. Deshalb bedienten wir uns in den späteren Ansätzen nur noch der Glasgefäße.

	Bestrahlt			Dunkelkontrolle
Katalysator	1 ccm	0,2 ccm	1 ccm H_2O	1 ccm
Bei der Titration verbrauchte Permanganatlösung . . ccm	5,8	4,9	2,4	0
Erhaltene Menge Indigo . mg	1,47	1,24	0,69	0

Versuch 2.

Wie vorstehend, jedoch in Röhren aus gewöhnlichem Glase[1]).

	Bestrahlt			Dunkelkontrolle
Katalysator	1 ccm	0,2 ccm	1 ccm H_2O	1 ccm
Zur Titration verbrauchte Permanganatlösung . . ccm	0,6	0,7	0	0
Erhaltene Menge Indigo . mg	0,15	0,18	0	0

Versuch 3.

Katalysator: 0,06 bis 0,3 ccm einer 1 $^0/_0$igen Lösung von Ferriammonsulfat.

Bestrahlungsdauer: 4 Stunden.

Gefäße: Glasröhrchen.

Verwendete Menge: 3 ccm 0,75 $^0/_0$ige Lösung von indoxylschwefelsaurem Kalium.

	Bestrahlt		Dunkelkontrolle
Katalysator	0,3 ccm	0,06 ccm	0,3 ccm
Zur Titration verbrauchte Permanganatlösung . . . . ccm	1,4	1,1	deutl. Spur
Erhaltene Menge Indigo . mg	0,36	0,28	—

Die vorstehenden Versuche lehren, daß die Oxydationsstufe des Eisens keinen nennenswerten Einfluß auf das Ergebnis ausübt, da selbst bei dem Zusatz von Ferrieisen im Dunkelversuche nur Spuren von Indigo gebildet wurden.

Versuch 4.

Katalysator: 1 $^0/_0$ige Lösung von Uranylsulfat.

Bestrahlungsdauer: 4 Stunden.

---

[1]) Siehe Anmerkung 3 auf S. 221.

Gefäße: Glasröhrchen.

Verwendete Menge: 3,0 ccm 0,75%iger Lösung von indoxylschwefelsaurem Kalium.

	Bestrahlt		Dunkel-kontrolle
Katalysator	0,3 ccm	0,06 ccm	0,3 ccm
Zur Titration verbrauchte Permanganatlösung . . . . ccm	0,9	0,7	0
Erhaltene Menge Indigo . mg	0,23	0,18	0

Neuberg[1]) hat schon darauf hingewiesen, daß außer den Eisen- und Uranverbindungen auch andere Metalle und Metalloide, die in verschiedenen Oxydationsstufen auftreten können, für diese Art von Photokatalysen geeignet sind. Wir zogen noch die schon früher als wirksam erkannten Mangano-, Ceri- und Cerosalze sowie Arseniat zu unseren Versuchen heran.

Versuch 5, 6 und 7.

Katalysatoren: α) 1%ige Lösung von Manganosulfat; β) 1%ige Lösung von Cerisulfat; γ) 1%ige Lösung von Kaliumarseniat.

Bestrahlungsdauer: 4 Stunden.

Gefäße: Glasröhrchen.

Verwendete Menge: 3,0 ccm 0,75%iger Lösung von indoxylschwefelsaurem Kalium.

	α			β			γ	
	Bestrahlt		Dunkel-kontrolle	Bestrahlt		Dunkel-kontrolle	Bestrahlt	Dunkel-kontrolle
Katalysator . .	Manganosulfat			Cerisulfat			Kaliumarseniat	
	0,3 ccm	0,06 ccm	0,3 ccm	0,3 ccm	0,06 ccm	0,3 ccm	0,3 ccm	0,3 ccm
Zur Titration verbrauchte Permanganatlösung . . . ccm	1,0	1,1	0	0,4	deutl. Spuren	0	0,4	0
Erhaltene Menge Indigo . . . . . mg	0,25	0,28	0	0,1	—	0	0,1	0

Versuch 8.

Über die Wirkung von Chloriden des 2- und 3-wertigen Cers gibt folgende Übersicht Aufschluß.

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 29, 281, 1910.

Katalysatoren: α) 1 % Cerochlorid; β) 1 % Cerichlorid.
Bestrahlungsdauer: 4 Stunden.
Gefäße: Glasröhrchen.
Verwendete Menge: 3,0 ccm 0,75 %iger Lösung von indoxylschwefelsaurem Kalium.

	α			β			γ		
	Bestrahlt	Sonnenversuch	Dunkelversuch	Bestrahlt	Sonnenversuch	Dunkelversuch	Bestrahlt	Sonnenversuch	Dunkelversuch
Katalysator . . .	Cerochlorid 0,3 ccm			Cerichlorid 0,3 ccm			Wasser 0,3 ccm		
Zur Titration verbrauchte Permanganatlösung . . . ccm	3,1	Spuren	0	1,1	Spuren	0	0,7	Spuren	0
Erhaltene Menge Indigo . . . . . mg	0,79	—	0	0,28	—	—	0,18	—	0

Als Vertreter der zuvor (s. S. 220) erwähnten organischen Katalysatoren benutzten wir zwei Anthracenderivate, das 2,7-anthrachinondisulfosaure Natrium und das 9,10-dichloranthracen-2,7-disulfosaure Natrium.

Versuch 9 und 10.

Katalysatoren: α) 1 %ige Lösung von 2,7-anthrachinondisulfosaurem Natrium; β) 1 %ige Lösung von 9,10-dichloranthracen-2,7-disulfosaurem Natrium.
Bestrahlungsdauer: 4 Stunden.
Gefäße: Glasröhrchen.
Verwendete Menge: 3,0 ccm 0,75 %ige Lösung von indoxylschwefelsaurem Kalium.

	α				β			
	Bestrahlt		Sonnenversuch	Dunkelversuch	Bestrahlt		Sonnenversuch	Dunkelversuch
Katalysator	2,7-anthrachinondisulfosaures Na				9,10-dichloranthracen-2,7-disulfosaures Na			
	0,3 ccm	0,06 ccm	0,3 ccm	0,3 ccm	0,3 ccm	0,06 ccm	0,3 ccm	0,3 ccm
Zur Titration verbrauchte Permanganatlösung . ccm	0,7	deutl. Spuren	Spuren	0	2,9	deutl. Spuren	2,5	0
Erhaltene Menge Indigo mg	0,18	—	—	0	0,74	—	0,64	0

In den bisher beschriebenen Versuchen 1 bis 10 spielte sich die Lichteinwirkung in neutraler Lösung ab. Daß der photolytische Effekt auch in saurer Lösung noch deutlich zutage tritt, wo allerdings das indoxylschwefelsaure Kalium auch im Dunkeln etwas verändert wird, zeigen die folgenden Versuche. In der Dunkelkontrolle wird ebenfalls Indigo gebildet, doch entsteht im Lichte sehr deutlich mehr.

Versuch 11 und 12.

Katalysator: 1 $^0/_0$ Ferriammonsulfat.

Zusätze: α) 0,3 ccm $^n/_{10}$-Salzsäure; β) 0,3 ccm n-Essigsäure.

Bestrahlungsdauer: $^1/_2$ Stunde.

Gefäße: Glasröhrchen.

Verwendete Menge: 3,0 ccm 0,75 $^0/_0$iger Lösung von indoxylschwefelsaurem Kalium.

	α 0,3 ccm $^n/_{10}$-Salzsäure			β 0,3 ccm n-Essigsäure		
	Bestrahlt		Dunkelversuch	Bestrahlt		Dunkelversuch
Katalysator	0,3 ccm	0,06 ccm	0,3 ccm	0,3 ccm	0,06 ccm	0,3 ccm
Zur Titration verbrauchte Permanganatlösung . . . ccm	1,5	1,1	1,0	1,4	1,2	0,6
Erhaltene Menge Indigo . mg	0,38	0,28	0,25	0,36	0,31	0,15

Alle 12 Versuche zeigen ohne Ausnahme, daß Licht aus einer farblosen Indigovorstufe in Gegenwart von geringen Mengen verschiedenartiger Katalysatoren Indigoblau entwickelt.

Über das Wesen der natürlichen Bernsteinsäurebildung.

I. Mitteilung.

Die Bernsteinsäuregärung der α-Ketoglutarsäure.

Von

C. Neuberg und M. Ringer.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie zu Berlin-Dahlem.)

Die zuckerfreie Gärung aller α-Ketosäuren verläuft nach allen bisherigen Erfahrungen grundsätzlich in gleicher Weise: Unter der Wirkung der Hefen-Carboxylase verlieren diese Substanzen Kohlensäure und es entsteht der Aldehyd der um ein Kohlenstoffatom ärmeren Reihe: $R \cdot CO \cdot CO_2H = CO_2 + R \cdot COH$. Dieser Aldehyd kann alsdann in mehr oder minder größerem Umfange weiter verändert werden, wobei in der Hauptsache durch die reduzierenden Agenzien der Hefe eine Hydrierung zum zugehörigen Alkohol erfolgt. Gelegentlich treten neben den genannten Produkten auch kleine Mengen Säure auf, jedoch ist ihre Bildung eine untergeordnete[1]).

Dieses Verhalten zeigen alle bisher geprüften aliphatischen α-Ketomonocarbonsäuren und auch die näher geprüfte Oxalessigsäure (Oxobernsteinsäure), $COOH \cdot CO \cdot CH_2 \cdot COOH$. Denn diese liefert unter Abspaltung zweier Carboxylgruppen Acetaldehyd. Bei dem labilen Charakter der Oxalessigsäure muß es unentschieden bleiben, ob nicht ihr Abbau bei der zuckerfreien Gärung über die Brenztraubensäure führt, die durch Verlust eines Moleküls CO_2 daraus hervorgehen kann.

Es schien uns wichtig, für die Beurteilung der Carboxylasewirkung eine weitere α-Ketodicarbonsäure zu untersuchen,

[1]) Siehe die Bildung von Valeriansäure bei der Gärung der Methyläthylbrenztraubensäure. C. Neuberg und W. H. Peterson, diese Zeitschr. 67, 32, 1914.

die beständiger als die Oxalessigsäure ist und keine Neigung zum Verlust eines Carboxyls zeigt. Wir wählten für diese Untersuchung die α-Ketoglutarsäure, $COOH.CH_2.CH_2.CO.COOH$, die zugleich in derselben Beziehung zur Glutaminsäure steht, wie die übrigen α-Ketosäuren zu anderen Eiweißspaltungsprodukten.

Schon früher haben C. Neuberg und Joh. Kerb[1]) angegeben, daß die α-Ketoglutarsäure der zuckerfreien Gärung fähig ist. Die Gärungsprodukte sind damals nicht untersucht worden; ihre Aufklärung bildet einen Gegenstand der vorliegenden Untersuchung.

Vorversuche zeigten uns, daß die α-Ketoglutarsäure von verschiedenen Hefen — sowohl obergärigen wie untergärigen — sowie von Hefemacerationssaft in Gärung versetzt wird. Am geeignetsten erwies sich von lebenden Hefen die obergärige Hefe OM sowie die untergärige Hefe U; von Säften der Macerationssaft K und S.

Der Verlauf der Gärung ist ein sehr glatter. Er führt zur Kohlensäure und zu einer zweiten Säure, der Bernsteinsäure:

$$COOH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CO \cdot COOH \rightarrow COOH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH + CO_2.$$

Dabei möchten wir hervorheben, daß hinsichtlich der Vollständigkeit der Reaktion die zuckerfreie Gärung der α-Ketoglutarsäure alle früheren Erfahrungen übertrifft. Denn es ist uns gelungen, innerhalb 3 Tagen 99,2 % der Theorie zur Bernsteinsäure zu vergären.

Wie ersichtlich, weicht die zuckerfreie Gärung der α-Ketoglutarsäure von der entsprechenden Umsetzung anderer Vertreter dieser Gruppe auch insofern ab, als eine Säure und kein Aldehyd oder Alkohol neben der obligaten Kohlensäure gebildet wird. In dieser Beziehung verhält sich die α-Ketoglutarsäure also genau wie die Glutaminsäure, $COOH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CHNH_2 \cdot COOH$, die bei ihrer Zerlegung durch arbeitende Hefe in Gegenwart von Zucker nach F. Ehrlich[2]) gleichfalls in Bernsteinsäure übergeht. In diesem Umstande muß man wohl ein Argument zugunsten der Anschauung erblicken, daß bei der erwähnten Glutaminsäure-Umwandlung die α-Ketoglutarsäure eine Zwischenstufe darstellt.

[1]) C. Neuberg und Joh. Kerb, diese Zeitschr. 47, 415, 1912.

[2]) F. Ehrlich, diese Zeitschr. 18, 391, 1909.

Zum Unterschiede von der Bildung der Glutaminsäure, die nur in Gegenwart von lebender und gärender Hefe gelingt, entsteht die Bernsteinsäure aus α-Ketoglutarsäure unter der Wirkung der Carboxylase, ohne daß die Hefe lebt oder Zucker vergärt. Durch diese zuckerfreie Gärung der α-Ketoglutarsäure ist zum erstenmal Bernsteinsäure durch rein enzymatischen Abbau erhalten worden. Diese Umwandlung der α-Ketoglutarsäure kommt im Gegensatz zu allen anderen Gärungen der α-Ketosäuren, die sich als Decarboxylierungen mit eventuell anschließender Reduktion darstellen, auf eine Oxydationsgärung heraus. Der glatte Verlauf und die fast theoretische Ausbeute an Bernsteinsäure schließen es völlig aus, daß die genannte Säure nach dem Schema der Cannizzaroschen Reaktion etwa aus intermediär gebildeter Aldehydopropionsäure, $COOH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COH$, hervorgeht. Es muß der Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben, ob diese Aldehydopropionsäure als Zwischenstufe auftritt, ob sie gegebenenfalls einfach durch den Luftsauerstoff oder, was wahrscheinlicher wäre, durch Oxydasen zur Bernsteinsäure oxydiert wird, oder durch Entziehung von Sauerstoff aus anderen Stoffen des Hefezellinhalts die gedachte Umwandlung erfährt.

Die Bernsteinsäure wurde stets in Substanz isoliert und als solche oder in Form ihres Silbersalzes zur Analyse gebracht.

Experimentelles.

A. Darstellung der α-Ketoglutarsäure.

Die α-Ketoglutarsäure kann man am besten durch Kombination der Vorschriften von W. Wislicenus und M. Waldmüller[1]) einerseits sowie von E. E. Blaise und H. Gault[2]) anderseits darstellen.

Das Ausgangsmaterial bildet der Oxalbernsteinsäureester, der durch Kondensation von Oxalsäure- und Bernsteinsäureäthylester gewonnen wird. Diese Kondensation wird am vorteilhaftesten nach der Vorschrift von Wislicenus und Wald-

[1]) W. Wislicenus und M. Waldmüller, 44, 1564, 1911.

[2]) E. E. Blaise und H. Gault, Bull. Soc. chim. [4] 9, 455, 1911.

müller ausgeführt, die Spaltung jedoch nach der Angabe von Blaise und Gault.

Wir verfuhren folgendermaßen: Der zunächst erhaltene Kalium-Oxalbernsteinsäureester wurde auf der Nutsche mit Äther gewaschen und alsdann in Wasser gelöst; die wässerige Lösung wurde zwecks Entfernung von Verunreinigungen noch zweimal mit Äther ausgeschüttelt. Darauf wurde die wässerige Schicht mit Äther übergossen und verdünnte Schwefelsäure bis zur deutlichen Reaktion auf Congo zugegeben. Die abgehobene ätherische Lösung wurde in üblicher Weise über entwässertem Glaubersalz unter Zugabe kleiner Mengen Bariumcarbonat zwecks Bindung etwa vorhandener freier Schwefelsäure getrocknet. Die filtrierte Ätherlösung wurde alsdann im Vakuum bei höchstens 30° eingeengt. Es hinterblieb ein hellgelbes, dickflüssiges Liquidum. Wir können die Angabe von Blaise und Gault bestätigen, daß dieser freie Oxalbernsteinsäureester keine Destillation im Vakuum verträgt, indem er dabei Kohlenoxydspaltung unter Bildung von Äthantricarbonester erleidet und daß die von Wislicenus früher aus dem Destillat durch Säurespaltung erhaltene Substanz Bernsteinsäure, aber keine α-Ketoglutarsäure gewesen ist.

Dagegen lieferte der sirupöse Oxalbernsteinsäureester beim Kochen mit einem Gemisch von 2 Teilen rauchender Salzsäure und 4 Teilen Wasser ganz glatt α-Ketoglutarsäure, die sofort analysenrein ist. Die von den Autoren angegebene lästige Reinigung durch Umkrystallisieren aus Eisessig oder Umlösen aus Essigäther-Petroläther ist unnötig. Wir dampften die mit Salzsäure hydrolysierte Lösung einfach im Vakuum zur Trockne ein, wobei die Masse zu einem Krystallbrei erstarrte. Derselbe wird in Äther aufgenommen und die filtrierte ätherische Lösung hinterläßt beim Verdunsten die α-Ketoglutarsäure in dicken Krusten. Die hartnäckig anhaftende, vielleicht oxoniumartig gebundene Salzsäure entfernt man am schnellsten durch Ausbreitung der zerkleinerten Krystallmasse auf Tonteller und durch deren Aufbewahrung im Vakuumexsiccator über Natronkalk.

Bezüglich des Verhaltens der α-Ketoglutarsäure seien folgende ergänzende Angaben gemacht. Die Säure gibt gleich anderen Ketosäuren mit Nitroprussidnatrium und Natron-

lauge eine vorübergehende rote Färbung, die auf Zusatz von Essigsäure etwas beständiger ist.

Versetzt man eine konz. Lösung von α-Ketoglutarsäure mit einer starken Lösung von Silbernitrat oder Merkuronitrat, so erhält man sofort dicke, weiße Niederschläge, die in viel heißem Wasser und Salpetersäure löslich sind. Dieses Verhalten zeigt die große Stärke der α-Ketoglutarsäure, die schon in freier Form Silbernitrat fällt. Auch mit der α-Ketobuttersäure[1]) sowie mit Brenztraubensäure, Oxalessigsäure und α-Ketocapronsäure gelingt derselbe Versuch.

B. Gärung der α-Ketoglutarsäure.

1. Vorversuche über die Gärung.

Zur Verwendung gelangte eine $^m/_{10}$-α-Ketoglutarsäurelösung (1,46 g in 100 ccm Wasser). 17 ccm $^m/_{10}$-α-Ketoglutarsäure lieferten mit 1,7 g Hefe OM innerhalb 24 Stunden 7 ccm Kohlensäure bei 37°.

Die Lösung von 0,15 g α-Ketoglutarsäure in 1 ccm H_2O wurde vorsichtig zu 16 ccm Macerationssaft S gesetzt. Nach Zugabe von 0,5 ccm Toluol entwickelten sich bei 37°:

Nach	10 Min.	1,0 ccm	CO_2
„	14 Std.	7,0 „	„
„	22 „	7,5 „	„
„	52 „	9,0 „	„

Das Gas erwies sich in allen Fällen als reines Kohlendioxyd.

Zum Vergleich führen wir einen Gärungsversuch mit äquivalenten Mengen Brenztraubensäure und α-Ketoglutarsäure an.

I. 0,1 g Ketoglutarsäure wurden in 1 ccm Wasser gelöst und mit 20 ccm Macerationssaft S versetzt.

II. 0,06 g Brenztraubensäure wurden in 1 ccm Wasser gelöst und mit 20 ccm Macerationssaft S gemischt.

Bei 28° entwickelten sich ccm CO_2

Nach	1h	4h	21h
bei I	4,0	12,0	18,0
„ II	4,5	5,5	13,0

[1]) C. Neuberg und Joh. Kerb, diese Zeitschr. 47, 417, 1912.

Man sieht daraus, daß die Gärung der α-Ketoglutarsäure mehr CO_2 als die der Brenztraubensäure liefert.

Vergärung der α-Ketoglutarsäure mit frischer Hefe.

Versuch 2.

10 g Ketoglutarsäure wurden in 1000 ccm zwecks Sterilisation zum Sieden erhitzten und bis auf 40° wieder abgekühlten Wassers gelöst, darauf mit 100 g Hefe OM versetzt und in den Brutschrank von 37° gestellt. Nach 8 Tagen, wo noch vereinzelte Gasblasen aufstiegen, wurden wieder 50 g Hefe zugegeben. Nach 16 tägigem Stehen im Brutschrank wurde abfiltriert und das Filtrat im Vakuum bis zum Sirup eingedampft. Eine Prüfung mit Phenylhydrazin ergab, daß noch unverändertes Ausgangsmaterial vorhanden war. Der ganze Rückstand wurde deshalb in wenig Wasser gelöst, mit etwas mehr Bisulfitlösung versetzt, als der doppelten Menge[1]) des Ausgangsmaterials entspricht, und im Perkolator mit Äther ausgezogen. Bereits nach einer Stunde begann Bernsteinsäure an den Wandungen des Ätherbehälters auszukrystallisieren. Die Extraktion war nach 98 Stunden beendigt. Aus dem Äther schieden sich 1,2 g Bernsteinsäure vom nahezu richtigen Schmelzpunkt (183°) aus. Da theoretisch aus 146 g Ketoglutarsäure 118 g Bernsteinsäure entstehen können, entspricht obige Ausbeute 15 % der theoretischen Möglichkeit.

Der natriumbisulfithaltige, mit Äther erschöpfte Rückstand wurde mit etwas mehr als der berechneten Menge verdünnter Schwefelsäure versetzt und am Rückflußkühler bis zur Verflüchtigung der schwefligen Säure erhitzt. Die Flüssigkeit wurde dann 26 Stunden lang im Perkolator mit Äther extrahiert. Es wurden auf diese Weise 3,2 g α-Ketoglutarsäure vom Schmelzpunkt 112° zurückgewonnen.

Versuch 3.

5 g α-Ketoglutarsäure wurden in 500 g Leitungswasser, das vorher $^1/_2$ Stunde lang zum Sieden erhitzt und dann auf 40° abgekühlt war, gelöst. Diese Lösung wurde mit 30 g

[1]) Nach Versuchen von L. Czapski (diese Zeitschr. 71, 167, 1915) genügt die einfache Menge nicht.

frischer Hefe OM versetzt, mit einem Wattebausch verschlossen und in den Brutschrank (37°) gestellt. Nach 3 Tagen wurden noch 30 g Hefe OM hinzugegeben und nach abermals 3 Tagen weitere 30 g Hefe OM. Nach 13 tägiger Gärung im Brutschrank wurde das Gemisch auf dem Wasserbade erhitzt und filtriert. Das im Vakuum stark eingeengte, sauer reagierende Filtrat wurde mit der gleichen Menge Alkohol versetzt; von den Ausscheidungen wurde abfiltriert und mit heißem Alkohol nachgewaschen. Das Filtrat wurde nun im Faust-Heimschen Apparat eingeengt und die restierende Lösung mit doppelt soviel starker Bisulfitlösung versetzt als der angewandten Ketoglutarsäure entsprach. Dabei schieden sich kleine Mengen anorganischer Salze aus. Das klare Filtrat wurde im Perkolator 165 Stunden lang mit Äther ausgezogen und lieferte so 0,9 g Bernsteinsäure = 22,3 % der Theorie. Schmelzpunkt 182 bis 183°.

Die Analyse der aus Wasser umkrystallisierten und bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Substanz ergab folgende Zahlen:

0,0966 g lieferten 0,1431 g CO_2 und 0,0470 g H_2O

$C_4H_6O_4$.Ber. C = 40,68; H = 5,09 %;

Gef. C = 40,41; H = 5,40 %.

Da bekanntlich bei Gärungen kleine Mengen Bernsteinsäure auftreten können, die ihre Entstehung zerfallenem Hefeeiweiß verdanken, so haben wir gleichzeitig einen Versuch mit derselben Menge Hefe — ohne Zusatz von α-Ketoglutarsäure — allein in Wasser zur Kontrolle angesetzt.

Kontrolle auf Bernsteinsäurebildung aus der angewandten Hefemenge.

Versuch 4.

500 ccm Leitungswasser wurden ½ Stunde zum Sieden erhitzt und auf 40° C abkühlen gelassen. Dann wurden unter besonderer Beobachtung der Sterilität 90 g frische Hefe OM eingeführt und gleichzeitig 2,5 g Natriumfluorid zugesetzt[1]). Das Gemisch wurde im Brutschranke bei 37° belassen. Nach 13 tägiger Digestion wurde mit etwa ½ ccm Eisessig angesäuert,

[1]) Ohne Zusatz des Antisepticums trat nach 6 bis 7 Tagen Bakterienentwicklung ein.

aufgekocht, abfiltriert und mit heißem Wasser nachgewaschen. Das im Faust-Heimschen Apparat eingeengte Filtrat wurde mit Alkohol versetzt, bis der hierdurch entstehende Niederschlag sich nicht weiter vermehrte. Das klare alkoholische Filtrat wurde abermals im Faust-Heimschen Apparat eingeengt und der Rückstand einer erschöpfenden Ätherextraktion im Perkolator unterworfen. Man erhielt nach 108 stündiger Extraktion nur ca. 2 mg eines Körpers, der ganz unscharf bei 260^0 schmolz und in dem keine Bernsteinsäure nachgewiesen werden konnte.

Dieses Ergebnis ist leicht verständlich, wenn man bedenkt, daß eine erkennbare Umbildung der Glutaminsäure zur Bernsteinsäure nur bei gleichzeitigem Ablauf einer alkoholischen Gärung erfolgt, während in unserem Falle die Hefe ohne Zucker digeriert wurde.

Besonders beweisend ist der quantitative Übergang der α-Ketoglutarsäure in Bernsteinsäure unter dem Einfluß von Hefemacerationssaft. Letzterer enthält höchstens Spuren Bernsteinsäure[1]), und es findet in ihm auch keine Neubildung von Bernsteinsäure aus Bestandteilen der Hefe statt.

Zellfreie Vergärung der α-Ketoglutarsäure durch Macerationssaft.

Zwei zu verschiedenen Zeiten ausgeführte Versuche gaben das gleich gute Resultat.

Versuch 5.

1,3 g α-Ketoglutarsäure wurden in 2 ccm Wasser gelöst und mit 130 ccm frischem Macerationssaft S versetzt. Zur Verhinderung der Fäulnis wurden 3 ccm Toluol hinzugefügt. Nach 6 tägiger Gärung im Brutschrank bei 37^0 war das anfängliche Eiweißkoagulum durch Endotryptase größtenteils wieder gelöst, beim Erhitzen schied sich jedoch noch Eiweiß aus. Die Gärungsflüssigkeit wurde mit 2 ccm Eisessig angesäuert und mit 600 ccm Alkohol sowie 150 ccm Äther versetzt, worauf ein flockiger Niederschlag sich zu Boden setzte. Am nächsten Tage wurde er abfiltriert und mit Alkohol nachgewaschen. Das Filtrat wurde nun im Vakuum eingeengt. Während der Destilla-

---

[1]) Vgl. E. Buchner u. J. Meisenheimer, Ber. 39, 3201, 1906.

tion krystallisierte an den Wandungen des Kolbens ein Körper aus, der gegen 260° schmolz. Der gesamte Rückstand wurde mit Wasser aufgenommen und nach Zugabe von hinreichend Bisulfit mit Äther im Perkolator extrahiert. Nach 109 Stunden erhielten wir 0,26 g Bernsteinsäure vom Schmelzpunkt 183°.

Der Rückstand wurde mit etwas mehr als der berechneten Menge verdünnter Schwefelsäure versetzt und am Rückflußkühler bis zur Austreibung der schwefligen Säure erhitzt. Darauf wurde er mit Äther in der üblichen Weise ausgezogen. Nach 24 stündigem Extrahieren wurden noch 0,4 g direkt auskrystallisierte Bernsteinsäure gewonnen, frei vom Ausgangsmaterial und bei 181 bis 183° schmelzend. Bei weiterer Extraktion ging in den Äther eine braungefärbte, sirupöse Substanz über, die nicht erstarrte und auf einen Gehalt an Bernsteinsäure durch Überführung in das Bariumsalz geprüft wurde.

Zu diesem Zwecke wurde die Substanz in wenig Ammoniak gelöst und dessen Überschuß fortgekocht; nach dem Abfiltrieren einer harzigen Beimengung wurde mit Bariumchlorid gefällt. Da diese Substanz Bariumsulfat einschloß, das mitextrahierter Schwefelsäure entstammte, so wurde sie mit verdünnter heißer Salzsäure ausgezogen und nach dem Einengen auf dem Wasserbade unter Zusatz von ein wenig $BaCl_2$ durch Zugabe von Ammoniak wieder abgeschieden. Dieses Bariumsalz war nach der Analyse fast rein und gab die Gegenwart von Bernsteinsäure u. a. dadurch zu erkennen, daß die Pyrrolprobe nach Neuberg[1]) mit Spuren positiv ausfiel. Die Menge des so gewonnenen Bariumsalzes belief sich auf 0,75 g, entsprechend 0,35 g Bernsteinsäure. Im ganzen wurden also 1,01 g = 96,2 % der Theorie erhalten.

Die Reinheit der direkt abgeschiedenen Bernsteinsäure wurde außer durch den Schmelzpunkt durch die Titration mit $^{n}/_{10}$-KOH erwiesen.

0,1298 g Substanz verbrauchten 21,9 ccm $^{n}/_{10}$ KOH; berechnet: 22,0 ccm $^{n}/_{10}$ KOH.

Auffallenderweise ist, wie beschrieben, nicht alle Bernsteinsäure direkt aus der bisulfithaltigen Lösung mit Äther extrahiert worden, vielmehr gewinnt man die ganze Menge erst

[1]) Siehe bei C. Neuberg, Der Harn, **1911**, S. 278.

nach dem Kochen der Lösung mit verdünnter Schwefelsäure am Rückflußkühler. Offenbar ist ein Teil der Bernsteinsäure in Form einer Verbindung zugegen, die erst nach der Hydrolyse freie Bernsteinsäure liefert. Wahrscheinlich handelt es sich um esterartige Verbindungen (saure Ester), die auch Ehrlich[1]) beobachtet und zum Teil ätherunlöslich befunden hat.

Versuch 6.

1,5 g α-Ketoglutarsäure wurden in 2 ccm Wasser gelöst und zu 150 ccm frischem Saft gegeben. Das Gemisch wurde mit 3 ccm Toluol versetzt. Nach 3 tägiger Gärung bei 37° wurde die Flüssigkeit mit Eisessig gerade angesäuert und mit 700 ccm Alkohol gefällt. Am nächsten Tage wurde von einem flockigen Niederschlage abfiltriert, mit Alkohol nachgewaschen und im Faust-Heimschen Apparat eingeengt. Der wässerigen Lösung des Rückstandes wurde nach Zugabe von hinreichend Natriumbisulfitlösung die freie Bernsteinsäure durch Extraktion mit Äther entzogen. So wurden 0,85 g Bernsteinsäure (Schmelzpunkt 183°) unmittelbar gewonnen. Der natriumbisulfithaltige Rückstand wurde mit verdünnter Schwefelsäure gekocht und einer erneuten Extraktion mit Äther 60 Stunden hindurch unterworfen. Unmittelbar schieden sich noch 0,35 g Bernsteinsäure vom Schmelzpunkte 184° aus. Die Gesamtausbeute betrug daher 99,2 % der Theorie. Eine sirupöse Mutterlauge wurde hier nicht erhalten. Dieses Mal wurde die Bernsteinsäure zum Zwecke der Analyse in das Silbersalz verwandelt.

0,1785 g des Silbersalzes, bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, lieferten 0,1154 g Ag.

$C_4H_4O_4Ag_2$. Ber. Ag. = 65,03 %, gef. 64,66 % Ag.

Damit ist das Vorliegen von Bernsteinsäure erwiesen.

Im Einklange mit der durch die Ausbeuten angezeigten quantitativen Zerlegung der Ketoglutarsäure steht es, daß keinerlei unverändertes Ausgangsmaterial bei den Versuchen mit Saft nachgewiesen werden konnte.

Zur Sicherung der Ergebnisse wurden noch die folgenden Kontrollen angesetzt:

Einmal wurde die verwendete und 3 Tage bebrütete Saftmenge auf einen Gehalt an Bernsteinsäure untersucht (Ver-

---

[1]) F. Ehrlich, Wochenschr. f. Brauerei 1913, Nr. 43.

such 7) und anderseits wurde der etwaige Eintritt eines Selbstzerfalls von wässeriger α-Ketoglutarsäurelösung unter Bildung von Bernsteinsäure geprüft (Versuch 8). Beide Proben ergaben ein negatives Resultat.

Versuch 7.

Prüfung auf Bernsteinsäuregehalt in digeriertem Macerationssaft.

1 ccm Wasser wurde mit 100 ccm Saft und 2,0 ccm Toluol 3 Tage lang bei 37° stehen gelassen. Hierauf wurde die Mischung mit Essigsäure angesäuert, erhitzt und mit 500 ccm Alkohol gefällt. Am nächsten Tage wurde vom abgesetzten Niederschlage abfiltriert und mit Alkohol nachgewaschen. Das Filtrat wurde in üblicher Weise verarbeitet. Nach 143 stündiger Extraktion mit Äther wurde eine braune Substanz gewonnen, die wohl Spuren von Bernsteinsäure enthalten, aber ihrer geringen Menge wegen nicht rein gewonnen werden konnte. Die Gesamtmenge des extrahierten Stoffes betrug überhaupt nur etwa 1 mg.

Versuch 8.

Prüfung auf einen etwaigen Selbstzerfall der α-Ketoglutarsäure unter Bildung von Bernsteinsäure.

1 g Ketoglutarsäure wurde in 100 ccm Leitungswasser, das $^1/_2$ Stunde lang zum Sieden erhitzt und hierauf bis auf 40° abgekühlt war, gelöst. Die Flasche wurde mit einem Wattebausch verschlossen und 13 Tage im Brutschrank bei 37° stehen gelassen. Danach wurde die Lösung mit doppelt soviel titrierter Natriumbisulfitlösung versetzt, wie theoretisch nötig war. Nach 60 stündiger Erschöpfung mit Äther konnte in dem letzteren keine Bernsteinsäure gefunden werden.

Zum Schlusse möchten wir noch auf den Umstand hinweisen, daß die Bernsteinsäuregärung der α-Ketoglutarsäure am besten mit Macerationssaft ausgeführt wird. Mit diesem verläuft die Umwandlung quantitativ. Es liegt hier einer der nicht gerade häufigen Fälle vor, wo das von der lebenden Zelle getrennte Enzym seine chemische Wirkung leichter, schneller und ausgiebiger entfaltet, als sie bei Verwendung des fermenttragenden Organismus zum Ausdruck kommt.

Über das Wesen der natürlichen Bernsteinsäurebildung.

II. Mitteilung.

Die Entstehung von Bernsteinsäure bei der Fäulnis von α-Ketoglutarsäure.

Von

C. Neuberg und M. Ringer.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie zu Berlin-Dahlem.)

In einer Reihe von Mitteilungen konnten Neuberg und seine Mitarbeiter experimentell die Anschauung begründen, daß die α-Ketosäuren nicht nur beim Abbau der zugehörigen Aminosäuren durch Hefe das wesentliche Zwischenprodukt sind, sondern auch bei der Fäulnis.

Die Gruppe R-CO-COOH ist offenbar in biochemischer Hinsicht von besonderer Bedeutung. Der Carbonylrest bedingt eine Auflockerung des Moleküls, die jene Angriffe erleichtert, die auf eine Molekülverkleinerung abzielen. Die Entstehung der Fettsäuren bei der Fäulnis der Proteine gehört hierher, da ein Teil dieser Säuren durch Kohlenstoffkettenverkürzung gebildet werden. An den Beispielen der Brenztraubensäure [1]), der α-Ketobuttersäure [2]), sowie der Methyläthylbrenztraubensäure [3]) konnte gezeigt werden, daß bei der Fäulnis die Umwandlung zu beträchtlichem Teil in der angegebenen Richtung verläuft und zur Essigsäure, Propionsäure sowie Valeriansäure führt. Die Carboxylgruppe der Ketosäuren geht dabei in Kohlensäure bzw. Ameisensäure über, welch letztere vielleicht erst durch sekundäre Reduktion aus CO_2 in statu nascendi entsteht.

---

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 67, 90, 1914.
[2]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 67, 122, 1914.
[3]) C. Neuberg und B. Rewald, diese Zeitschr. 71. 122, 1915.

Wie man sieht, besteht eine Analogie zwischen dem Abbau der α-Ketosäuren durch Fäulnis und der Spaltung durch die Carboxylase. Die Ähnlichkeit erstreckt sich auch auf die Umwandlung der α-Ketodicarbonsäuren; von diesen ist bisher nur Oxalessigsäure untersucht, die bei der Fäulnis unter doppelter Abspaltung von CO_2 Essigsäure ergibt[1]). Nachdem wir in der voraufgehenden Mitteilung das Verhalten der α-Ketoglutarsäure bei der Gärung aufgeklärt und ihren quantitativen Übergang in Bernsteinsäure festgestellt haben, lag es nahe, das Verhalten dieser interessanten α-Ketosäure auch bei den Vorgängen der Fäulnis zu studieren. Wie schon früher mehrfach erörtert ist, empfiehlt es sich hierfür nicht, einen Erreger in Reinzucht zu verwenden, sondern Mischkulturen anzuwenden. Denn diese entsprechen besser den natürlichen Verhältnissen und sie haben eine weit größere Zersetzungsenergie. Von einer Zugabe von Kohlenhydraten haben wir abgesehen, um durch ihre Spaltungsprodukte das Bild der Ketosäurefäulnis nicht zu trüben.

In der Tat entsteht bei der Fäulnis der α-Ketoglutarsäure Bernsteinsäure, von der wir 14 bis 19% der theoretisch möglichen Menge in krystallisiertem Zustande abscheiden konnten. Es ist nun beachtenswert, daß die Fäulnis der Glutaminsäure, der zur α-Ketoglutarsäure gehörigen α-Aminosäure, gleichfalls Bernsteinsäure, wenn auch in bescheidener Quantität, liefert. Als Hauptprodukt entsteht bei der Glutaminsäurefäulnis nämlich durch weitere Kohlenstoffkettenverkürzung n-Buttersäure[2]). Auch bei der Fäulnis der α-Ketoglutarsäure entstehen reichlich flüchtige Säuren, die allerdings hier eine andere Zusammensetzung hatten, indem sie aus einem Gemisch von Ameisensäure, Essigsäure und Propionsäure bestehen. Dieses Ergebnis haben wir in mehreren und der Art ihrer Anstellungen voneinander etwas variierenden Versuchen zu verzeichnen gehabt, so daß wir den Schluß ziehen müssen, daß ein Teil der α-Ketoglutarsäure unter dem Einfluß von Fäulniserregern in komplizierter Weise abgebaut wird.

Die immerhin reichliche Bildung von Bernsteinsäure läßt

---

1) C. Neuberg, diese Zeitschr. 67, 92, 1914.

2) C. Neuberg, Sitzungsber. d. Kgl. preuß. Akad. d. Wissensch. 1907, Sitzung v. 16. Mai; diese Zeitschr. 7, 183, 1907; 18, 431, 1909; W. Brasch und C. Neuberg, diese Zeitschr. 13, 299, 1908.

sich natürlich und ungezwungen in Analogie zu dem Abbau unter dem Einfluß der Carboxylase setzen. Durch eine Spaltung im Sinne der Formulierung:

$$\begin{array}{c} COOH.CH_2.CH_2.CO \\ | \\ COOH \end{array} + \begin{array}{c} OH \\ | \\ H \end{array} = \begin{array}{c} COOH.CH_2.CH_2.COOH \\ + \\ H.COOH \end{array}$$

läßt sich auch die Herkunft der Ameisensäure leicht deuten. Schwieriger ist es, eine Erklärung für die Entstehung von Essigsäure und Propionsäure zu geben. Letztere kann natürlich durch Spaltung des Moleküls an anderer Stelle:

$$COOH.CH_2.CH_2. \;\vdots\; CO.COOH,$$

entstehen, ist doch die α-Ketoglutarsäure nichts anderes als Oxalpropionsäure. Auf ganz unsicherer Grundlage muß sich zurzeit der Versuch bewegen, die unzweifelhafte Entstehung der Essigsäure zu deuten. Eine theoretische Möglichkeit ihrer Bildung läge in der Spaltung der in Enolform reagierenden α-Ketoglutarsäure; diese könnte im Sinne der Formulierung:

$$\begin{array}{r} COOH.CH_2.CH: \\ + \\ O \end{array} \begin{array}{c} \vdots \\ \vdots \\ \vdots \end{array} \begin{array}{l} C(OH).COOH \\ \\ H_2 \end{array}$$

in den Halbaldehyd der Malonsäure oder dergl. übergehen, von dem aus verschiedene Wege zur Essigsäure führen.

Wie auch die Deutung der Tatsachen im einzelnen sein mag, der charakteristische Abbau der α-Ketoglutarsäure bei der Fäulnis schließt sich dem Verhalten der übrigen α-Ketosäuren an, und die Entstehung der Bernsteinsäure bei diesem Vorgange spricht dafür, daß diejenige Menge Glutaminsäure, die bei der Fäulnis zu Bernsteinsäure wird, auf dem Wege über die α-Ketoglutarsäure abgebaut wird.

Experimentelles.

Versuch 1.

10 g α-Ketoglutarsäure wurden in 200 ccm Leitungswasser von 40° gelöst und mit einer Kaliumcarbonatlösung bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt. Hierzu wurden 2 Tropfen der Lösungen, resp. je 1 Körnchen von Dinatriumphosphat, Calciumchlorid, Natriumchlorid, Eisenchlorid, Magnesiumsulfat, Ammoniumsulfat und Kaliumnitrat gegeben. Das Gemisch wurde noch mit 800 ccm Wasser von 40° versetzt und die Fäul-

nis mit ca. 10 ccm einer nach der Vorschrift von E. Salkowski hergestellten, 24 Stunden alten Fäulnismischung eingeleitet. Nach 21tägigem Stehen im Brutschrank bei 37° — während welcher Zeit die Faulflüssigkeit stets alkalisch blieb — wurde mit konzentrierter Phosphorsäurelösung kongosauer gemacht und das Reaktionsgemisch einer Wasserdampfdestillation unterworfen, bis die übergehenden Tropfen nicht mehr sauer reagierten. Im ganzen betrug die Menge des Destillates 9180 ccm. 100 ccm hiervon verbrauchten 3,72 ccm $^{n}/_{10}$-NaOH, was einer Gesamtacidität von 34,15 ccm n-NaOH entspricht. Nun wurde das Destillat mit Sodalösung gegen Phenolphthalein eben alkalisch gemacht und auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde 10 mal mit je 100 ccm kochendem Alkohol von 97 % ausgezogen, nach vorheriger Durchfeuchtung mit etwas Wasser. Die Menge der nach Verdampfen des Alkohols zurückgebliebenen Natriumsalze betrug 2,6 g. Eine kleine Probe davon gab auf Zusatz von konzentrierter Silbernitratlösung ein Silbersalz, das sich jedoch in der Siedehitze schwärzte und dadurch einen Gehalt an Ameisensäure zu erkennen gab. Auch mit Mercurichlorid entstand Kalomel, wodurch gleichfalls die Gegenwart von Formiat bewiesen war. Daher wurde das ganze Natriumsalz in 50 ccm Wasser gelöst, mit 100 ccm 2 n-H_2SO_4 angesäuert und zwecks Zerstörung der Ameisensäure mit 20 g Mercurisulfat 1 Stunde lang am gut wirkenden Rückflußkühler erhitzt. Von ausgeschiedenem Quecksilberoxydulsalz wurde abfiltriert und zur Entfernung des in Lösung befindlichen Quecksilbers Schwefelwasserstoff eingeleitet. Aus dem Filtrat wurde der letztere hernach durch 10 Minuten langes Durchblasen von Luft verdrängt. Hierauf wurde die Schwefelsäure mit warmen Barytwasser gefällt und dessen Überschuß durch Einleiten von Kohlensäure entfernt, wobei die Flüssigkeit auf dem Wasserbade erwärmt wurde. Nach Abfiltrieren der ausgeschiedenen Bariumsalze und Nachwaschen mit heißem Wasser wurde die Lösung bis auf etwa 25 ccm eingedampft. Zunächst wurden nach genauer Neutralisation durch verdünnte Salpetersäure mit einigen Tropfen einer verdünnten Silbernitratlösung Spuren von Chloriden, darauf im Filtrat mit einer 60 %igen Silbernitratlösung ein Salz gefällt, das jetzt lichtbeständig war. Die Ausbeute an gut mit kaltem Wasser, dann mit 50 %igem Alkohol und schließlich

mit absolutem Alkohol ausgewaschenem Silbersalz betrug 2,0 g. Dasselbe enthielt 62,54 % Ag.

0,1436 g Substanz gaben 0,0898 g Silber.

Daraus läßt sich ein Gehalt an Propionsäure und Essigsäure entnehmen. Silberacetat enthält 64,66 % Ag, propionsaures Silber 59,65 % Ag.

Der kongosaure Rückstand der Wasserdampfdestillation wurde im Vakuum eingeengt und zur Entfernung von Verunreinigungen mit Alkohol und etwas Äther versetzt. Das Filtrat hiervon wurde wiederum im Vakuum stark eingeengt und mit 20 ccm einer 23,2 % SO_2 enthaltenden Natriumbisulfitlösung versetzt. Nach Filtrieren wurde die klare Flüssigkeit 78 Stunden lang im Perkolator mit Äther extrahiert. Auf diese Weise wurden 1,55 g Bernsteinsäure vom Schmelzpunkt 185° gewonnen, was 19,18 % der theoretisch möglichen Ausbeute, auf das ganze Ausgangsmaterial berechnet, gleichkommt. Die Analyse der bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Substanz lieferte folgende Werte:

0,1020 g Substanz ergaben 0,1515 g CO_2 und 0,0478 g H_2O.

$C_4H_6O_4$. Ber.: C = 40,68, H = 5,09 %;
gef.: C = 40,51, H = 5,20 %.

Versuch 2.

10 g α-Ketoglutarsäure wurden in der gleichen Weise zur Fäulnis angesetzt und 25 Tage im Brutschrank bei 37° stehen gelassen. Die mit Wasserdampf übergetriebene saure Flüssigkeitsmenge betrug 5260 ccm, deren Gesamtacidität diesesmal nur 9,75 ccm n-NaOH entsprach. Aus dem mit Soda eingedampften Gemisch der Fettsäurelösung wurde mit Alkohol bloß 0,5 g Natriumsalze extrahiert, die zum großen Teil aus Formiat bestanden. Es wurde daher von einer genauen Untersuchung der flüchtigen Fettsäuren hier Abstand genommen.

Der phosphorsaure Rückstand der Wasserdampfdestillation wurde im Faust-Heimschen Apparat eingeengt und mit Alkohol versetzt. Von dem sich bildenden Niederschlage wurde abfiltriert. Das abermals im Faust-Heimschen Apparat eingeengte Filtrat wurde wie im vorigen Versuch mit Äther extrahiert. Trotz 156 stündiger Extraktion erhielten wir keine direkt auskrystalli-

sierende Bernsteinsäure, sondern einen dicken braunen Sirup, der auch bei längerem Stehen nur zum Teil erstarrte. Deshalb wurde er mit Gips und etwas Wasser angerührt und einer erneuten Ätherextraktion unterworfen. Nach Abdestillieren des Äthers hinterblieb jetzt die Bernsteinsäure fast rein. Es wurden 1,3 g Bernsteinsäure gewonnen = 16,08 $^0/_0$, auf die angewandte Ketoglutarsäuremenge berechnet.

Versuch 3.

Diesesmal wurden 10 g α-Ketoglutarsäure in 1000 ccm Leitungswasser von 40^0 gelöst und mit 11 g festem Calciumcarbonat versetzt, das sich zum Teil ungelöst am Boden absetzte. Dabei trat jedoch keine völlige Neutralisation ein, so daß durch Zugabe von einigen Tropfen Sodalösung schwach alkalische Reaktion hergestellt wurde. Nun wurden außer den in den vorhergehenden Versuchen zugesetzten Salzen noch eine Spur Kaliumchlorid hinzugefügt. Die Fäulnis wurde mit ca. 8 ccm eines Fäulnisinfuses eingeleitet; nach 14 Tagen wurden noch einige Kubikcentimeter frische Faulmischung hinzugegeben. Das Gemisch blieb 26 Tage verkorkt im Brutschrank bei 37^0. Darauf wurde es mit Schwefelsäure kongosauer gemacht. Es wurden sodann mit Wasserdampf 10480 ccm übergetrieben, deren Acidität — nach einer Bestimmung an 100 ccm dieser Flüssigkeit — 132,05 ccm n-NaOH entsprach. Die Menge der mit Alkohol ausgezogenen Natriumsalze betrug 10,7 g. Diese wurden in 500 ccm Wasser gelöst und 30 ccm 2 n-H_2SO_4 hinzugegeben. Es mußten 25 g Mercurisulfat zugesetzt werden, bis nach 8 stündigem Kochen keine Ameisensäure mehr nachzuweisen war. Das dann, wie zuvor beschrieben, erhaltene Silbersalz wurde zunächst mit kaltem Wasser, darauf mit 50 $^0/_0$ igem und später mit absolutem Alkohol gewaschen. Die Menge des Silbersalzes betrug 5,0 g.

0,2209 g Substanz ergaben 0,1391 g Ag; das entspricht 62,98 $^0/_0$ Silber.

Der bei der Wasserdampfdestillation verbliebene Rückstand wurde wiederum im Faust-Heimschen Apparat eingeengt und mit Alkohol ausgezogen. Die alkoholische Lösung wurde alsdann verdunstet, in Wasser aufgenommen und mit Gips angerührt. Durch 30 stündiges Extrahieren mit Äther wurden

daraus 1,1 g Bernsteinsäure vom Schmelzpunkt 183 bis 184° gewonnen, was 13,61 % der Theorie entspricht.

Versuch 4.

10 g α-Ketoglutarsäure wurden wie in den Versuchen 1 und 2 der Fäulnis überlassen. Nach 27 tägigem Stehen im Brutschrank bei 37° wurde das Reaktionsgemisch in der in Versuch 3 angegebenen Weise verarbeitet. Das Destillat der Wasserdampfdestillation betrug 9500 ccm und dessen Gesamtacidität war = 85,5 ccm n-NaOH. Die Menge der fettsauren Natriumsalze belief sich auf 7,5 g. Zur Zerstörung der beigemengten Ameisensäure waren 30 g Mercurisulfat und ein 6 stündiges Erhitzen unter Rückfluß notwendig. Das wie in den vorigen Versuchen erhaltene reine Silbersalz wog 2,5 g und enthielt 62,90 % Ag. 0,2113 g Substanz gaben 0,1329 g Ag.

Der im Destillierkolben bei der Wasserdampfdestillation verbliebene Rückstand wurde nach der im Versuch 3 beschriebenen Vorbehandlung mit Gips angerührt und mit Äther ausgezogen. Der Äther hinterließ 4 g einer Substanz, die jedoch zum beträchtlichen Teil aus unveränderter Ketoglutarsäure bestand. Daher wurde sie in wenig Wasser gelöst, mit der auf die angewandte Ketoglutarsäure berechneten Menge einer Natriumbisulfitlösung versetzt und im Perkolator mit Äther erschöpfend extrahiert. Es wurden so 1,13 g Bernsteinsäure gewonnen = 13,98 % der Theorie. Schmelzpunkt 184°.

Um uns zu vergewissern, daß nicht auch bei längerem Stehen im Brutschranke unter der Einwirkung der Salze sowie der schwach alkalischen Reaktion ein rein chemischer Zerfall der α-Ketoglutarsäure in Bernsteinsäure und flüchtige Fettsäuren stattfindet, haben wir folgende Kontrolle angestellt.

Versuch 5.

1 g α-Ketoglutarsäure wurde in 100 ccm Leitungswasser von 40° gelöst, mit Kaliumcarbonatlösung schwach alkalisch gemacht und mit den gleichen Salzen, die in den früheren Versuchen benutzt waren, versetzt. Zur Hinderung der Fäulnis wurde 1 ccm Chloroform zugefügt. Nach 20 tägigem Stehen im Brutschrank bei 37° wurde mit Phosphorsäure kongosauer ge-

macht und das Gemisch der Wasserdampfdestillation unterworfen. Es ging nichts Saures über.

Der Inhalt des Destillierkolbens wurde genau wie in den vorigen Versuchen auf Bernsteinsäure verarbeitet. Nach Zusatz von hinreichend Natriumbisulfit konnte auch nach 55 stündiger Extraktion mit Äther keine Bernsteinsäure ausgezogen werden.

Aus den mitgeteilten Versuchen geht hervor, daß bei der Fäulnis der α-Ketoglutarsäure regelmäßig Bernsteinsäure gebildet wird. Nebenher entstehen flüchtige Fettsäuren in wechselnder Menge; auch wird bald die gesamte α-Ketoglutarsäure zersetzt, bald nur ein Teil. Von einer Ermittlung der entstandenen Ameisensäure haben wir Abstand genommen, da sie nach den vorliegenden Erfahrungen als unspezifisches Spaltungsprodukt bei jeder Ketosäurenfäulnis auftritt. Die Menge der homologen Fettsäuren unterliegt gewissen Schwankungen. Im allgemeinen scheint ihre Menge in den Versuchen größer zu sein, wo die Quantität der Bernsteinsäure geringer ist. Auffallend konstant ist die Zusammensetzung, die fast durchgehends einem Gemisch von rund 60% Essigsäure und 40% Propionsäure entspricht.

Über die Vorgänge der natürlichen Milchsäurebildung.

Zugleich eine Entgegnung an Herrn M. Oppenheimer in Frankfurt a. M.

Von

Carl Neuberg und **Joh. Kerb** (z. Z. im Felde).

I.

Über die Wirkungsweise des Ferments, das die Umwandlung des Methylglyoxals in Milchsäure, $CH_3.CO.COH + H_2O = CH_3.CHOH.COOH$, katalysiert, gehen die Ansichten auseinander. Um nichts zu präjudizieren, ist[1]) das Ferment nach der üblichen Nomenklatur als eine Ketonaldehydmutase bezeichnet. Denn das Substrat, das umgewandelt wird, das Methylglyoxal, erscheint als Ketonaldehyd. Damit trat die Reaktion in ungezwungene Beziehung zu einem schon bekannten Vorgange, der Cannizzaroschen Umlagerung der Aldehyde; auch diese wird durch ein Enzym katalysiert, das J. Parnas aufgefunden und als Aldehydmutase benannt hat[2]).

Die Analogie liegt klar zutage; hier wie dort handelt es sich um die Reduktion einer Carbonylgruppe auf Kosten der zweiten, die sich oxydiert, um einen Vorgang, der sich unter Beteiligung eines Moleküls Wasser vollzieht.

Wenn die Reaktion bei den Aldehyden[3])

$$\begin{matrix} R.COH \\ R_1.COH \end{matrix} + H_2O = \begin{matrix} R.CH_2OH \\ + \\ R_1.COOH \end{matrix}$$

---

[1]) C. Neuberg, Abhandl. in C. Oppenheimers Handb. d. Biochem.; eingegangen am 27. II. 1913; diese Zeitschr. **49**, 502, 1913; **51**, 484, 1913.

[2]) J. Parnas, diese Zeitschr. **28**, 274, 1910.

[3]) Die Cannizzarosche Reaktion kann zwischen zwei verschiedenen Aldehyden eintreten; Lit. hierzu s. bei J. Parnas (l. c.).

als Cannizzarosche Reaktion bezeichnet wird, so erscheint sie bei dem Ketonaldehyd

$$\begin{array}{l} R.CO \\ | \\ COH \end{array} + H_2O = \begin{array}{l} R.CHOH \\ | \\ COOH \end{array}$$

als eine „innere Cannizzarosche Reaktion". Die Analogisierung beider Prozesse ist keineswegs neu[1]), sie erfolgt in allen Lehrbüchern sowie auch in der Fachliteratur, wenn auch der Name „innere Cannizzarosche Reaktion" nicht gebraucht ist.

So heißt es in Richters Organ. Chem., Neueste Aufl. (1909), Bd. I, S. 362 wörtlich:

„Durch Alkalien wird Glyoxal schon in der Kälte in Glykolsäure übergeführt, wobei die eine CHO-Gruppe reduziert, die andere oxydiert wird — vgl. Benzil und Benzilsäure, Bd. II —:

$$\begin{array}{l} CHO \\ | \\ CHO \end{array} + H_2O = \begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ COOH. \end{array}$$ "

Hier wird also die Cannizzarosche Reaktion mit der Benzilsäureumlagerung verglichen!

Im Lehrbuche der Organ. Chem. von V. Meyer-Jacobson, 1. II., Neueste Aufl. (1913) heißt es S. 815—816:

„Eine eigentümliche Veränderung erleidet das Glyoxal durch die Einwirkung der Alkalien schon in der Kälte; indem die eine Hälfte des Moleküls reduziert, die andere oxydiert wird, entsteht Glykolsäure:

$$\begin{array}{l} CHO \\ | \\ CHO \end{array} + \left\{\begin{array}{l} H_2 \\ O \end{array}\right. = \begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ COOH. \end{array}$$ "

S. 856 desselben Bandes steht bei V. Meyer-Jacobson zu lesen:

„Eine interessante Reaktion des Methylglyoxals ist der Übergang in Milchsäure, der . . . der Umwandlung von Glyoxal in Glykolsäure entspricht."

Und ebendort S. 557 heißt es vom Methylglyoxal:

„das sich unter dem Einfluß des Alkalis unter gleichzeitiger Reduktion seiner Ketongruppe und Oxydation seiner Aldehydgruppe in Milchsäure verwandelt."

Fast mit denselben Worten wird auf S. 678 in Bd. 1, I, desselben Lehrbuches das Wesen der Cannizzaroschen Reaktion dahin formuliert, „daß ein Teil des Aldehyds sich zur entsprechenden Säure oxydiert,

---

[1]) Für die Auffassung ist es ganz gleich, ob man eine intermediäre Esterbildung zwischen dem aus Aldehyd entstehenden Alkohol und der Säure annimmt; bei den Ketonaldehyden entspricht dieser Umlagerung zum Ester die Lactidentstehung.

und zwar auf Kosten eines anderen Teils, der demzufolge zum entsprechenden Alkohol reduziert wird."

Aus der Fachliteratur sei nur ein Zitat von J. Parnas [1]) angeführt, das lautet: „Sie (d. h. die Cannizzarosche Reaktion) kann auch intramolekular verlaufen, was aus dem Übergang von Glyoxal in Glykolid resp. Glykolsäure hervorgeht."

Das Ferment, das den Übergang von Methylglyoxal in Milchsäure katalysiert, gehört auf alle Fälle in die Gruppe der Oxydo-reducasen, die nach Carl Oppenheimers [2]) treffender Bezeichnung die Enzyme sämtlicher hydroklastischen Reaktionen umfaßt.

Die Identität aller dieser Fermente ist keineswegs erwiesen, und schon durch die Benennung „Ketonaldehydmutase" ist zum Ausdruck gebracht worden, daß diese mit dem Enzym der Cannizzaroschen Reaktion, der Aldehydmutase, nicht ohne weiteres identifiziert, sondern verglichen werden soll [3]); denn es bestehen weitgehende Ähnlichkeiten.

Dakin und Dudley [4]), die gleichzeitig und unabhängig dasselbe Ferment aufgefunden haben, erkennen diese Analogie auch an; sie behaupten aber [5]), daß die Ähnlichkeiten nur oberflächliche seien und daß der Katalysator der biologischen Methylglyoxalumwandlung, die „Glyoxalase", von der Aldehydmutase verschieden und durch eine spezifische Empfindlichkeit gegen Pankreasextrakt gekennzeichnet sei.

Selbst im Falle einer Artverschiedenheit von Glyoxalase und Aldehydmutase bleibt der Katalysator der Methylglyoxalumwandlung ein prinzipiell zur gleichen Gruppe gehöriges Ferment, für das der Name Ketonaldehydmutase eben die wenigsten Voraussetzungen in sich birgt [6]).

---

[1]) J. Parnas, l. c. S. 286.

[2]) Carl Oppenheimer, Die Fermente, **1913**, 759.

[3]) Siehe die Ausführungen von C. Neuberg, diese Zeitschr. **51**, 486, 1913.

[4]) H. D. Dakin und H. W. Dudley, Journ. of Biol. Chem. **14**, 155, 423, 1913; **15**, 463, 1913; **16**, 505, 1914.

[5]) H. D. Dakin und H. W. Dudley, diese Zeitschr. **59**, 194, 1914; Journ. of Biol. Chem. **16**, 511, 1914.

[6]) Der von Dakin und Dudley (s. Zitate sub 5) mit besonderem Eifer verteidigte Name „Glyoxalase" ist zum mindesten ungenau. Durch mehrere Versuche haben wir uns davon überzeugt, daß ein Organextrakt, d. h. eine Fermentlösung, die aus Methylglyoxal Milchsäure er-

Wichtiger als die Nomenklaturfrage ist die Kennzeichnung des Enzyms. Eine grundsätzliche Bedeutung käme der erwähnten Angabe von Dakin und Dudley zu, daß Pankreasenzym die „Glyoxalasen" spezifisch hemme, aber ohne Einfluß auf die Aldehydmutase sei. Diese Behauptung haben wir nachgeprüft, aber bisher nicht bestätigen können. Dabei ist die Versuchsanordnung der englischen Autoren (Journ. **16**, 511) genau innegehalten.

Als Substrate wählten wir Isovaleraldehyd und Methylglyoxal; als Pankreatin kam ein hervorragend wirksames Trypsin von Witte zur Anwendung.

Das Ergebnis von 5 Versuchen war folgendes:

Der Zusatz von Pankreassubstanz setzte die Wirkung der Aldehydmutase um 23, 28, 35, 35,5 und 38%, im Durchschnitt um 32% herab, gemessen an der entstandenen Menge titrierbarer Valeriansäure.

Die Zugabe der Pankreassubstanz verminderte die Umwandlung von Methylglyoxal in Milchsäure um 33,5, 37, 47, 49 und 49%, im Mittel also um 43%. [Die Bestimmung der

---

zeugt, das einfache monomolekulare Glyoxal nicht umwandelt. Ähnliche Erfahrungen müssen wohl auch Dakin und Dudley selbst gemacht haben, da sie als einziges wissenschaftliches Argument für die Berechtigung des Namens Glyoxalase anführen können (Journ. of Biol. Chem. **16**, 510, 1914), daß eine überlebende Hundeleber bei der Durchblutung mit glyoxalhaltigem Blut zum Teil Glykolsäure liefere. Unzweifelhaft berechtigt aber der Organdurchblutungsversuch nicht zu der Annahme eines löslichen Enzyms. Wenn für die Umwandlung des Methylglyoxals ein mit Wasser ausziehbares Ferment vorhanden ist, für die Umwandlung des einfachen Glyoxals aber nicht, indem letztere nur mit dem überlebenden und durchbluteten Organ gelingt, so sind beide Vorgänge zunächst eben als verschieden zu betrachten. Dakin und Dudley verstehen unter „Glyoxalase" alle auf die Homologen des Glyoxals wirkenden Agentien; das scheint um so weniger angebracht, als der Durchblutungsversuch beim Isobutyl-, Benzyl- und Phenylglyoxal nicht nur zur entsprechenden Oxysäure, sondern auch zur zugehörigen Aminosäure führt (Journ. of Biol. Chem. **18**, 29, 1914). Aber davon ganz abgesehen, wäre der Name Glyoxalase für ein auf Methylglyoxal eingestelltes Ferment ebenso unzutreffend, wie etwa die Bezeichnung Kreatinase für ein gegen Arginin gerichtetes Enzym oder der Name Uricase für ein Ferment der Methylharnsäuren, Glucosidase für etwa auf Heptosen einwirkendes Ferment, Glucacetase für ein aus Traubenzucker Valeriansäure erzeugendes Enzym, Urease für ein Methylharnstoff hydrolysierendes Ferment usw.

Milchsäure geschah nach dem in dieser Zeitschr. **51**, 487 mitgeteilten und für diesen Zweck ausgearbeiteten Verfahren unter Benutzung der von uns vorgeschlagenen Calciumbicarbonatsuspension, die dann auch Dakin und Dudley (Journ. **15**, 467, und **16**, 512) verwendet haben.]

Die Unterschiede in der Beeinflussung von Aldehydmutase und Ketonaldehydmutase sind zu gering, als daß wir darin eine Differenzierung beider Katalysatoren erblicken könnten. Die Beweise für die Verschiedenheit, die Dakin und Dudley beigebracht zu haben glauben, sind also nicht stichhaltig. Ein wichtiger Punkt scheint dabei überhaupt unbeachtet geblieben zu sein. Unsere Angaben beziehen sich ausnahmslos auf das Methylglyoxal, während die von Dakin und Dudley über eine Antiglyoxalasewirkung des Pankreas mitgeteilten Versuche ausschließlich mit dem biologisch wohl anderswertigen Phenylglyoxal angestellt worden sind. Vielleicht bedingt dieser Umstand die Verschiedenheit der Befunde.

II.

Gleichfalls mit der natürlichen Milchsäurebildung hängen die Mitteilungen von Neuberg und Kerb[1]) zusammen. Herr M. Oppenheimer[2]) hat sich nun darüber beklagt, daß wir ihm eine „undeutliche Darstellung" vorgeworfen hätten. Dieses Urteil müssen wir nicht nur aufrecht erhalten, sondern im Zusammenhang mit O.s polemischen Bemerkungen dahin erweitern, daß wir seine Darstellung für irrig halten. Obgleich an sich ein Eingehen auf dialektische Auslassungen sich nicht verlohnt, glauben wir doch, uns durch eine einmalige Beleuchtung einiger Punkte den weiteren Mühen einer Diskussion unsachlicher Einwände entheben zu sollen.

a) O. hat früher (Zeitschr. f. physiol. Chem. **89**, 51) großen Wert auf die Gewinnung eines sterilen Hefenmacerationssaftes gelegt. Alle seine Maßnahmen bezwecken, eine supponierte natürliche Sterilität zu wahren. Nachdem Neuberg und Kerb (diese Zeitschr. **62**, 492) ihm nachgewiesen hatten, daß der gewöhnliche Ma-

---

[1]) C. Neuberg und Joh. Kerb, diese Zeitschr. **58**, 158, 1913; **62**, 489, 1914.

[2]) M. Oppenheimer, Zeitschr. f. physiol. Chem. **93**, 262, 1914.

cerationssaft weder steril, noch baktericid ist, nachdem wir daraus Milchsäure erzeugende Bacillen — wir haben niemals von typischen Milchsäurebakterien gesprochen — direkt gezüchtet und auf die von uns bestätigte Angabe E. Buchners („Zymasegärung", S. 206 u. 223) hingewiesen hatten, daß selbst 2% Toluol keine Gewähr für die regelmäßige Unterdrückung des Bakterienwachstums bietet, versucht nun O. die Frage so darzustellen, daß nicht die Gegenwart von Bakterien in Betracht komme, sondern die von eigentlichen Milchsäurebildnern. Demgegenüber genügt die Feststellung der allbekannten Tatsache, daß die Milchsäureproduktion ungefähr die verbreitetste Eigenschaft der ubiquitären Bakterien ist!

Daß außerdem 1% Glycerinaldehyd oder Dioxyaceton diese Bakterien abtötet, haben wir nicht beobachten können.

O. gibt jetzt zu, daß eine früher von ihm zur Sicherung seiner Ergebnisse herangezogene antibakterielle Kraft des Hefensaftes bedeutungslos ist.

b) Wir haben die Tatsache hervorgehoben, daß die zellfreie Gärung des Zuckers keine oder nur Spuren Milchsäure liefert, zumeist nur einige Zehntelprozent des angewendeten Zuckers. Wenn nun Glycerinaldehyd und Dioxyaceton bei der Vergärung in 1%iger Lösung zu 11,5 bis 23% in Milchsäure übergehen, so sahen und sehen wir noch jetzt in dieser Unstimmigkeit die Berechtigung zu einem Zweifel, ob auf Grund dieser Zahlen für die natürlich bei der Gärung auftretenden Milchsäurespuren die beiden Triosen als die „direkten" Vorstufen gelten dürften.

Gegen diese schlagenden Beweise der Zahlen weiß Herr O. nichts anderes vorzubringen, als sozusagen den Spieß umzudrehen und zu argumentieren: bei den Versuchen von Dakin und Dudley sowie von Neuberg mit Methylglyoxal entsteht ja auch mehr Milchsäure als dem natürlichen Vorkommen entspricht.

Dabei verschweigt O. aber, was wir hinsichtlich der biologischen Bedeutung der Reaktion angegeben haben. S. 25 der Monogr. von C. Neuberg „Die Gärungsvorg. u. d. Zuckerumsatz der Zelle" heißt es: „Sie (sc. die Milchsäurebildung aus Methylglyoxal) dürften zur Erklärung des Umstandes beitragen können,

daß hier ein Gemisch von racemischer und aktiver Milchsäure entsteht. Man hat sich wohl ein Gleichgewicht zwischen den verschiedenen möglichen Formen des Methylglyoxals vorzustellen." In der Biochem. Zeitschr. 62, S. 495 steht bei Neuberg und Kerb zu lesen: „Und selbst wenn sich zeigen sollte, daß diese Substanzen (sc. Brenztraubensäure und Methylglyoxal) bei den physiologischen Abbauprozessen gar keine Rolle spielen, so wird man doch stets auf ähnliche Zwischenformen zurückgreifen müssen." Vorsichtiger kann man sich kaum ausdrücken, und es gehört schon ein großes Maß von Dialektik zu dem Versuche, aus unseren zurückhaltenden Worten das Gegenteil herauszulesen.

c) Die Berechtigung unserer Darlegungen kann dadurch nicht geändert werden, daß Herr O. zwei Fragen durcheinanderwirft: die Bildung der Milchsäure und die des Glycerins. Der springende Punkt für die Erklärung einer Entstehung von $CH_3.CHOH.COOH$ ist und bleibt die Herleitung des Äthyl- und CO_2-Restes aus den Gebilden $COH — (CHOH)_x — CH_2OH$ bis $H.(CHOH)_x — CO — CH_2OH$. Die „direkte Bildung" von Milchsäure aus den Triosen, von der O. dauernd spricht, ist vorläufig ein nichtssagendes Spiel mit Worten. Für die Ansicht, daß Dioxyaceton „direkt", d. h. doch ohne ein Zwischenglied, sich in Milchsäure umlagere:

$$\begin{array}{lcl} CH_2OH & & CH_3 \\ | & \longrightarrow & | \\ CO & & CH.OH \\ | & & | \\ CH_2OH & & COOH \end{array}$$

gibt O. jetzt die Unwahrscheinlichkeit zu. Die ebensowenig gestützte unmittelbare Reaktion des Glycerinaldehyds:

$$\begin{array}{lcl} CH_2OH & & CH_3 \\ | & \longrightarrow & | \\ HCOH & & HCOH \\ | & & | \\ COH & & COOH \end{array}$$

scheint O. noch immer verteidigen zu wollen.

Die uns zugeschriebene Angabe, für die Bildung des Glycerins aus den Triosen spiele die Herleitung des Äthyl- und Kohlensäurerestes eine Rolle, kommt in unserer Dar-

legung nicht vor! Diese Behauptung O.s entspricht einfach nicht den Tatsachen. Unsere ausdrückliche Angabe, daß jederzeit an Stelle des Methylglyoxals der Glycerinaldehyd gesetzt werden könne, sobald seine Funktion als Zwischenstufe bewiesen sei, sowie die unbequeme Feststellung Dakins, daß die Reaktion $CH_3.CO.COH + H_2O \rightleftarrows CH_3.CHOH.COOH$ reversibel ist und dadurch einen neuen Gesichtspunkt für die Rolle des Methylglyoxals bringt, übergeht Herr O. dauernd.

In einen unlösbaren Widerspruch verwickelt er sich aber, wenn er für die abnorme Höhe der Glycerinbildung (23 $^0/_0$ des angewandten Dioxyacetons) die „künstlich geschaffenen optimalen Versuchsbedingungen" in Anspruch nehmen will. In der Zeitschr. f. physiol. Chem. **89**, S. 67—69 beschreibt O., daß bei der Vergärung von 1 g Dioxyaceton mit 100 ccm Macerationssaft bis 19,2 $^0/_0$ Glycerin auftreten. Ebenda S. 55 und 56 steht, daß unter denselben Konzentrationsverhältnissen im Saft bis 11,85 $^0/_0$ Milchsäure entstehen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **93**, S. 254 bis 256 heißt es bei O. für Macerationssaft, daß „Dioxyaceton ebenso gut, wenn auch langsamer vergärbar ist als Traubenzucker". Die Bedingungen in den drei Versuchsserien sind fast völlig gleich. Es ist nicht einzusehen, wieso sie in einem Falle optimal für die Glycerinbildung, ein anderes Mal für die Milchsäurebildung, ein drittes Mal für die reine Alkohol- bzw. Kohlensäurebildung sein sollen?

Wir haben die Entstehung von Milchsäure bei der zellfreien Vergärung 1 $^0/_0$ iger Lösungen von Traubenzucker in Macerationssaft mehrfach verfolgt und nie eine stärkere Umwandlung als zu 4 $^0/_0$, meistens aber unter 1 $^0/_0$ gefunden. Dabei ist eine Mitwirkung von Bacterien nicht einmal ausgeschlossen. Es ist für alle Fälle unlogisch, eine Gärbedingung das eine Mal als normal für die zymatische Spaltung, das andere Mal als optimal für die Bildung des Nebenproduktes Glycerin usw. zu bezeichnen.

d) Wir können es wohl nur auf eine Unkenntnis des englischen Ausdrucks zurückführen, wenn O. behauptet, die von uns zitierten Angaben über die Umwandlung von Methylglyoxal in Milchsäure existierten nicht. Die fraglichen Literaturstellen führen wir also wörtlich an. Es heißt Journ. of Biol. Chem. **14**, 560, 1913:

„Buchner and Meisenheimer's original experiments on the fermentation of methylglyoxal are unconvincing in the light of present knowledge, since we have shown that much acid may be formed from glyoxals by the action of glyoxalase present in the yeast cells."

Ebendaselbst S. 561:

„The relation of α-ketonic aldehyde formation is discussed ... in connection with the mechanism of alcoholic fermentation."

Weitere Angaben über Anwesenheit von Glyoxalase in Hefezellen s. bei Dakin und Dudley, ebendas. **14**, 431 u. **18**, 93.

e) Einen Haupttrumpf glaubt O. gegen uns auszuspielen, indem er in höhnender Weise uns eine Verwechslung von Cannizzaroscher Reaktion und Benzilsäureumlagerung[1]) meint vorhalten zu können. Wir wollen von der Ungenauigkeit ab-

---

[1]) Das Wesen der Benzilsäureumlagerung ist das Abspringen eines organischen Radikals von einem Kohlenstoffatom zum andern unter gleichzeitiger Aufnahme der Elemente des Wassers. Es ist nicht wahrscheinlich, daß Nefs (Annal. **357**, 215 u. 299, 1907) Auffassung des Übergangs von Methylglyoxal in Milchsäure als einer Benzilsäureumlagerung die Zustimmung aller Fachgenossen gefunden hat; denn hier springt kein organisches Radikal. Man kann unter Benutzung zweier anderer Methylglyoxalsymbole, der Ketenformeln, (s. Neuberg und Oertel, diese Zeitschr. **55**, 503, 1913, und Dakin und Dudley, Journ. of Biol. Chem. **14**, 561, 1913) die Umwandlung noch ganz anders zum Ausdruck bringen:

$$\alpha)\quad \begin{array}{l} CH_3.C\diagdown_{O} \\ \;\;\Vert\;\diagup \\ C(OH) \end{array} \text{ bzw. } \begin{array}{l} CH_3.C(OH) \\ \;\;\Vert \\ C(OH)_2 \end{array} + 2\,H_2O\ (\text{bzw. } 1\,H_2O) = \begin{array}{l} CH_3.CHOH \\ \;\;\vert \\ C(OH)_3; \end{array}$$

$$\begin{array}{l} CH_3.CHOH \\ \;\;\vert \\ C(OH)_3 \end{array} = H_2O + \begin{array}{l} CH_3.CHOH \\ \;\;\vert \\ COOH \end{array} \quad \text{oder}$$

$$\beta)\quad \begin{array}{l} CH_3.C(OH) \\ \;\;\Vert \\ CO \end{array} + H_2O = \begin{array}{l} CH_3.CHOH \\ \;\;\vert \\ COOH \end{array}$$

Hier erscheint das Methylglyoxal überall als ein Isomeres des Lactids, als ein Anhydrid der Milchsäure, wie Keten, $CH_2 = CO$, als das der Essigsäure.

Streifen möchten wir noch die Auslassungen O.s über unsere Formulierungen der Wasseraufnahme. Müssen wir Herrn O. denn wirklich auch noch darauf aufmerksam machen, daß es üblich ist, von der Ionisierung des H_2O bei der summarischen Wiedergabe von Hydratationen abzusehen? Cf. die Lehrbücher und die Formulierung bei Dakin, Journ. of Biol. Chem. **14**, 561.

sehen, daß wir nirgendwo beide Vorgänge „identifiziert“ haben; wir sprachen vollkommen deutlich (diese Zeitschr. 62, 497) von einem Vergleich und einer Analogie in gewissem Sinne.

Es ist uns nicht ganz klar, was Herr O. zum Ausdruck bringen will, wenn er mit Sperrdruck verkündet, wir hätten nachträglich die Bezeichnung „Benzilsäureumlagerung“ eingefügt. Nachträglich nach welchem Vorgang? Die Auffassung der Methylglyoxalumwandlung als Benzilsäureumlagerung hat Nef 1907 veröffentlicht, sie ist seitdem den Fachgenossen bekannt. Wer sich durch unsere „Einfügung“ im Jahre 1913 beeinträchtigt fühlen könnte, ist uns so unverständlich geblieben, wie O.s Formelbilder.

Wir verweisen Herrn O. einfach auf die mit unserer Darstellung übereinstimmenden und zuvor auf S. 246 bis 247 wörtlich wiedergegebenen Auffassungen der anerkanntesten Lehrbücher und der Originalarbeiten.

Am Tage, da das jüngste Heft der Biochemischen Zeitschrift ausgegeben wurde, am 20. August 1915, verschied

Paul Ehrlich,

der Mitbegründer und Mitherausgeber dieser Zeitschrift.

Wie beim Tode Liebigs und Pasteurs stehen an der Bahre des Verewigten die Vertreter vieler Disziplinen, die seinen Heimgang als einen der schwersten Verluste empfinden, der ihre Wissenschaft treffen konnte.

Unauslöschlich ist der Name Paul Ehrlich mit der biochemischen Forschung verbunden. Ein jeder ihrer Jünger hat seines Geistes einen Hauch verspürt. In die Ewigkeit folgen Paul Ehrlich unvergängliche Dankbarkeit, tiefe Verehrung und grenzenlose Bewunderung.

Über Acidosis und deren Regulation im menschlichen Körper.

Von

A. Begun, R. Herrmann und E. Münzer.

(Aus dem Prager Handelsspital. Vorstand: Prof. Dr. E. Münzer.)

(Eingegangen am 20. Juni 1915.)

Gegenüber den bisherigen experimentell und klinisch wohlfundierten Anschauungen über die Folgen und die Regulationsvorgänge bei Säuerung im Tierorganismus hat in den letzten Jahren eine Theorie allgemeine Anerkennung gefunden, nach der wir in der Kohlensäurespannung des venösen Blutes ein sicheres Zeichen für die „tatsächliche Acidosis“ besitzen sollen, ja die Atmung als Regulationsmechanismus bezeichnet wird, der „durch vermehrte Abdunstung die Kohlensäurespannung des Blutes herabsetzt und damit Säurevalenzen entfernt“.

Diese Theorie, von Porges, Leimdörfer und Markovici[1]) geäußert, die bisher einer eingehenden Kritik noch nicht unterzogen wurde, soll im nachfolgenden auf ihre Stichhaltigkeit geprüft werden.

Bevor wir jedoch an die Mitteilung unserer Untersuchungen herantreten, erscheint es zunächst nötig, der Methode der Bestimmung der Kohlensäurespannung einige Worte zu widmen.

I. Die Kohlensäurespannung im venösen Blute.

a) Methodisches.

Eine einfache Methode zur Bestimmung der Kohlensäurespannung und damit zur Bestimmung des Kohlensäuregehaltes des Venenblutes verdanken wir Plesch[2]).

Wir wollen diesbezüglich den Autor selbst sprechen lassen. Plesch sagt (l. c. S. 107): „Es ist klar, wenn wir die alveoläre Sauerstoff- und Kohlensäurespannung feststellen können, d. h.

[1]) O. Porges, A. Leimdörfer und E. Markovici, Über die Kohlensäurespannung des Blutes in pathologischen Zuständen. Zeitschr. f. klin. Med. 73, Heft 5 und 6, S. 39 des Sonderabdruckes.

[2]) J. Plesch, Hämodynamische Studien. A. Hirschwald, Berlin 1909.

mit anderen Worten, die Spannung derjenigen Luft, die mit dem Blute des rechten Herzens Gleichgewicht hält, so können wir mit großer Genauigkeit auf den Gasgehalt des venösen Blutes schließen.

Das Prinzip meiner Methode zur Bestimmung der Gasspannungen im venösen Blute besteht im wesentlichen darin, daß gewissermaßen der Lungenluftraum nach außen erweitert wird, indem die intrathorakalen Luftsäcke der Lunge mit einem außerhalb befindlichen Gummisack durch ein Mundstück in Verbindung gebracht werden, so, daß das Ganze ein geschlossenes System bildet.

Die Respirationsbewegungen der Versuchsperson führen dann lediglich dazu, daß das Gasgemenge im Sack sich mit den Gasen der Lunge vollständig ausgleicht. Das ganze Gasgemisch setzt sich so ins Spannungsgleichgewicht mit dem Lungenblute."

Die Analyse des schließlich im Gummisacke befindlichen Gasgemisches gibt uns die gesuchten Kohlensäurewerte. Den Versuch selbst kann man nach Plesch in zweierlei Form ausführen, entweder mit einem Sack oder mit einer Doppelsackeinrichtung, wobei man in letzterem Falle zunächst in einen größeren, 10 l fassenden, mit Stickstoff gefüllten Sack, zwei, drei Voratmungen machen, dann erst in einen kleineren, ca. 3 l fassenden Sack durch ca. 20 Sekunden atmen läßt und das in diesem kleineren Sacke befindliche Gas analysiert.

Porges bediente sich der einfacheren Einsackmethode. Um uns bezüglich der Verläßlichkeit beider Methoden zu orientieren, haben wir in einigen Versuchen die Kohlensäurespannung nach beiden Methoden bestimmt. Die nachstehende Tabelle gibt die gefundenen Resultate:

Tabelle I.

		Herrmann		Begun	
		1 Sack %	Doppelsack %	1 Sack %	Doppelsack %
I. Atmung	CO_2	4,32	4,91	4,88	5,26
	O_2	9,85	?	10,30	4,32
II. "	CO_2	5,64	5,57	5,95	5,89
	O_2	9,14	5,17	8,56	4,52
III. "	CO_2	6,03	6,01	6,47	6,39
	O_2	8,71	4,56	8,66	5,23

Es zeigt sich, daß bei entsprechender Vorsicht auch mit der Einsackmethode genaue Resultate der Kohlensäurespannung

gefunden werden, während die Sauerstoffspannung, wie dies schon Plesch hervorhob, mit der Einsackmethode nur unter Einhaltung gewisser Bedingungen richtig bestimmt werden kann.

Damit war also die Vorfrage erledigt, daß die von Porges und seinen Mitarbeitern gewählte einfachere Methode für den in Frage stehenden Zweck genügt.

b) Die normale Kohlensäurespannung im Blute des rechten Herzens.

Die ersten Autoren, die für den Menschen „die Kohlensäurespannung des venösen Blutes bei Körperruhe" bestimmten, waren Löwy und H. v. Schrötter[1]); nach ihnen liegt dieselbe bei 6 % oder 42,2 mm Hg. Nach Plesch, der in seiner Generaltabelle II (l. c) vier einschlägige Bestimmungen von Gesunden mitteilt, schwankt sie zwischen 6,43 bis 7,54 %, und nach Porges, Leimdörfer und Markovici zwischen 5,43 bis 7,4 %. Unsere Bestimmungen stimmen vorzüglich mit jenen von Löwy und v. Schrötter überein; danach ist die Kohlensäurespannung im Blute des rechten Herzens beim Menschen mit rund 6 % anzunehmen. Betreffs der Kohlensäurespannung des venösen Blutes bei demselben Individuum äußern Porges und seine Mitarbeiter, „daß dasselbe Individuum unter gleichen Umständen an verschiedenen Tagen dieselbe Kohlensäurespannung hat" (l. c. S. 12). Das ist mit einer gewissen Einschränkung richtig. Bei den genannten Autoren finden wir folgende Differenzen:

Fall M. Fr. An demselben Tage (Zeitdifferenz nicht ganz 1 Stunde): 5,55 bis 6,08, also 9,5 %.

Fall B. Dat. Zeitdifferenz 30 Minuten: 6,58 bis 7,03, also 7 %. An verschiedenen Tagen: Dr. N., 16. II. 1909 und 17. XII. 1909: 7,40 und 6,84 %, d. i. 8 %; Schwester H., 20. IV. und 28. IV.: 5,81 bzw. 6,35 %, also über 9 %; Schwester Igen: 27. IV. und 3. V.: 6,41 bzw. 7,30 %, also 13 %.

Unsere Bestimmungen zeigen nicht so große, immerhin gewisse Differenzen, und die CO_2-Spannung bei H. schwankt zwischen 5,96 bis 6,32 %, also in den am meisten voneinander abweichenden Bestimmungen um 6 %, und im Falle B. zwischen

[1]) A. Löwy und H. v. Schrötter, Untersuchungen über die Blutzirkulation beim Menschen. A. Hirschwald, Berlin 1905 u. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. I, 1905.

5,91 bis 6,10%, also um 3%. Derartige Schwankungen in der Kohlensäurespannung des Einzelindividuums sind also nicht als pathologisch anzusehen, sondern fallen in die normale Schwankungsbreite.

II. Bedeutung der Kohlensäurespannung bzw. des Kohlensäuregehaltes des Blutes.

Die Reaktion des Blutes ist eindeutig definiert durch die Wasserstoffionen-Konzentration. Diese aber hängt, wie Michaelis[1]) im Anschluß an die Untersuchungen Hendersons betont, ab vom Gehalt an Carbonaten, Phosphaten und Eiweiß. Da die Bedeutung der Phosphate und Eiweißkörper gegenüber jener der Carbonate außerordentlich gering ist, so können wir, wie Michaelis ausführt, das Blut betrachten als „ein Gemisch von $CO_2 + NaHCO_3$“ und können also schreiben:

$$[H^{\cdot}] = k_{CO_2} \cdot \frac{(CO_2)}{[NaHCO_3]}.$$

Schon einmal ist die Kohlensäure als Index der Alkalescenz des Blutes benützt worden. Es war Schmiedeberg-Walter[2]), der die Ansicht vertrat, die in den Geweben entstehende Kohlensäure werde durch die Alkalien des Blutes gebunden, auf diese Weise aus den Geweben abtransportiert und durch die Lunge ausgeschieden. Führe man nun stärkere Säuren experimenti causa in den Tierkörper ein oder komme es im Tierkörper zur Bildung starker Säuren, dann werden beim Kaninchen die Alkalien des Blutes von diesen Säuren sofort mit Beschlag belegt, während beim fleischfressenden Organismus und dem Menschen die Säuren zunächst durch Ammoniak neutralisiert werden; erst wenn das Ammoniakreservoir des fleischfressenden Organismus erschöpft wäre, würden auch die fixen Alkalien des Blutes zur Neutralisation dieser abnormen Säuren verwendet. Es käme also beim Kaninchen sofort, beim Fleischfresser erst bei höherem Grade von andauernder Säuerung zu einer Verarmung des Blutes an fixen Alkalien; sobald diese eintritt, könne die Kohlensäure nur ungenügend aus den Geweben aufgenommen werden, der Kohlensäuregehalt des Blutes sinke.

[1]) Michaelis, Die Wasserstoffionen-Konzentration. J. Springer, 1914. S. 88.

[2]) F. Walter, Untersuchungen über die Wirkung der Säuren auf den tierischen Organismus. Arch. f. experim. Pathol. u. Phar. 7, 148, 1877.

So gestatte also die Bestimmung des Kohlensäuregehaltes des Blutes einen Rückschluß auf die Alkalescenz desselben.

Tatsächlich fand Walter-Schmiedeberg auch bei experimenteller Säurevergiftung bei Kaninchen ein Absinken des Kohlensäuregehaltes des Blutes bis auf ganz geringe Werte von ca. 40% normal auf ca. 3% vor dem durch Säurezufuhr herbeigeführten Tode.

Den sich aufdrängenden Gedanken, daß vielleicht die Säurevergiftung zur verminderten Kohlensäureproduktion der Gewebe führe und so die Kohlensäureverminderung des Blutes zu erklären sei, haben Löwy und Münzer[1]) als hinfällig erwiesen, da das Blut säurevergifteter Kaninchen, das einen stark verminderten Kohlensäuregehalt aufwies, mit Kohlensäure von gewisser (3 bis 7%) Spannung geschüttelt, die entsprechenden Mengen von Kohlensäure nicht aufnahm.

So finden wir bei den genannten Autoren folgende Daten:

Vers. Nr.	Gewicht des Tieres g	Vergiftungsart	Blutdichte	CO_2-Gehalt d. Blutes in % d. Blutvol.	Bindungsfähigkeit des Blutes für Kohlensäure	
					bei % CO_2 im Schüttelglas	sind % CO_2 im Blute
1	1400	—	1042,6	44,96	2,196	28,43 normal
5	2400	0,79 g HCl pro 1 kg	1055,5	16,93	3,55	19,16
					7,53	22,26
6	2600	0,72 g HCl pro 1 kg	1045,0	10,13	5,571	16,34 dyspnoische Atmung
					7,752	19,95 dyspnoische Atmung

Die Bindungsfähigkeit für Kohlensäure war also im Blute säurevergifteter Kaninchen stark herabgesetzt, doch war das Blut noch imstande, etwas CO_2 zu binden, so daß Löwy und Münzer hervorheben, „die Veränderungen sind nicht derart, daß sie den Tod der Versuchstiere erklärlich machen, für ihn muß ein deletärer Einfluß auf die Gewebszellen verantwortlich gemacht werden“ (l. c. S. 88).

Porges, Leimdörfer und Markovici haben die starke Herabsetzung der Bindungsfähigkeit des Blutes für CO_2 einerseits und die Gewebsschädigung andererseits zu gering eingeschätzt und kommen so auf der Suche nach Erklärungsmöglichkeiten zur Atmung als Regulationsmechanismus.

[1]) A. Löwy und E. Münzer, Beiträge zur Lehre von der experimentellen Säurevergiftung. I. Mitteilung. Du Bois' Archiv 1901.

Bevor wir an eine Kritik dieser Anschauung gehen, erscheint es angezeigt, die Frage zu beantworten, wie sich der menschliche Organismus gegen Säurezufuhr verhält und durch welche Vorgänge er eine solche Säuerung auszugleichen trachtet.

III. Die Kohlensäurespannung bzw. der Kohlensäuregehalt des venösen Blutes des Menschen bei experimenteller Säurezufuhr.

Zur Entscheidung dieser Frage stellten die Herren Begun und Herrmann Selbstversuche an. Sie nahmen durch längere Zeit eine gleichmäßige Nahrung, deren tägliche Zusammensetzung aus vorliegender Tabelle ersichtlich ist.

	Semmel dkg	Butter dkg	Eier	Fleisch dkg	Kartoffel dkg	Reis dkg	Schinken dkg	Milch	Orange	Tee Tassen	Gemüse dkg	Zucker Stück
Begun . . .	21	8	7	18	—	16	16	0	0	3	20	12
Herrmann .	21	8	7	18	16	—	16	250	2	3	0	12

Sobald der Harn durch einige Tage eine gleichmäßige Zusammensetzung aufwies, wurde eine Reihe von Tagen Salzsäure (in Wasser) genommen. Nach Beendigung der Salzsäurezufuhr wurde die (alte) Diät noch 3 bis 4 Tage fortgesetzt und ebenso die Bestimmungen fortgeführt.

Bestimmt wurde während der ganzen Zeit (die also in drei Teile zerfällt: Vorperiode, Periode der Salzsäurezufuhr, Nachperiode): Einerseits die CO_2- und O_2-Spannung im Respirationssacke und andererseits im Harne N, NH_3, Cl, P_2O_5, Kreatinin und schließlich die Acidität des Harnes titrimetrisch mit Phenolphthalein als Indicator. Die nachfolgenden Tabellen II und III orientieren über die gefundenen Resultate.

Das Ergebnis der angestellten Versuche ist ganz eindeutig. Beide Versuchspersonen scheiden bei der ziemlich gleichen Nahrung fast gleiche Mengen Stickstoff aus, die sich zwischen $13^1/_2$ und 14 g bewegen; bei Herrn H., der die Kost viel länger innehielt, sehen wir während der Salzsäureperiode ein Ansteigen der Harnmenge und der Stickstoffausscheidung, während bei Herrn B. Harnmenge und Stickstoffausscheidung während der ganzen Versuchsperiode gleich bleiben. Dies beruht darauf, daß Herr B. die während der Salzsäureperiode

Tabelle II.

Herrmann.

Datum	CO_2 einer Atmosphäre %	O einer Atmosphäre %	Harnmenge ccm	N g	NH_3 g	N (NH_3) in % des N	P_2O_5 pro die g	Cl pro die g	Acidität in ccm n/10-NaOH	Kreatinin pro die g	Zugeführte Salzsäure ccm
17. II.	5,72	6,01	1200	16,58	0,98	4,80	2,54	—	—	—	—
18.	5,76	5,39	920	16,86	0,78	3,14	2,26	—	—	—	—
19.	6,28	5,47	970	18,02	0,85	3,88	2,40	—	—	—	—
20. II.	6,09	5,13	1260	14,67	0,69	3,80	2,15	—	390,0	—	—
21.	6,05	4,79	865	13,92	0,84	4,90	2,05	5,19	423,8	1,42	—
22.	6,32	5,54	830	13,30	0,77	4,73	2,24	5,39	468,8	1,55	—
23.	5,96	6,68	870	13,88	0,78	4,66	2,15	5,22	452,4	1,45	—
24.	6,03	6,43	840	13,78	0,78	4,64	2,35	5,29	528,8	1,47	—
25.	6,07	6,17	910	14,14	0,74	4,31	2,41	6,55	491,7	1,29	—
Mittel	6,08	5,79	929	13,78	0,76	4,50	2,22	5,53	459,2	1,43	—
26. II.	5,92	5,63	1150	15,71	0,91	4,77	2,89	7,93	586,5	1,62	15
27. II.	5,92	5,83	1250	13,58	1,19	7,00	2,53	7,88	625,0	1,37	15
28.	—	—	1830	15,52	1,43	7,60	2,93	9,15	713,7	1,50	30
1. III.	—	—	1300	15,52	1,40	7,41	2,53	7,15	676,0	1,48	10
2.	—	—	1030	14,70	1,31	7,28	2,38	6,48	607,0	1,47	15
3.	—	—	1065	15,02	1,30	7,12	2,49	7,45	617,7	1,39	15
4.	6,05	6,05	1475	16,68	1,62	7,38	2,66	8,11	722,75	1,66	20
5.	—	—	2000	—	—	—	—	—	—	—	25
6.	6,02	5,55	1885	14,51	1,67	10,19	2,44	9,43	659,7	1,56	25
7.	5,99	6,35	1800	15,30	1,71	9,21	2,35	10,26	702,0	1,58	25
Mittel	5,99	5,94	1454	15,10	1,45	7,89	2,53	8,23	665,4	1,50	—
8. III.	5,96	5,06	1590	15,27	1,55	8,31	2,16	7,15	620,1	1,78	—
9.	6,00	6,19	820	13,32	1,08	6,11	2,39	5,16	500,2	1,56	—
10.	5,99	4,95	1100	16,53	0,83	4,11	2,53	6,60	429,0	1,77	—

zur Salzsäurezufuhr nötige Wasserzulage in der Vor- und Nachperiode ebenfalls zu sich genommen hatte, während Herr H. während der Salzsäureperiode die Salzsäure in viel Wasser zu sich nahm, diese Wasserzulage aber in der Vor- und Nachperiode ausfiel, so daß die Mehrausscheidung an Harn und Stickstoff in der Zeit der Salzsäurezufuhr leicht verständlich ist.

Der Ammoniakgehalt des Harns beträgt in der Vorperiode bei Herrn H. $4^1/_2$ %, bei Herrn B. schon normalerweise etwas mehr, 5,6 %; letztere Zahl ist an und für sich etwas höher als gewöhnlich; doch wurde dies immer in gleicher Weise bei Herrn B. beobachtet. Es sind dies aber Ammoniakwerte, die noch der Norm entsprechen und nur darauf hindeuten, daß

Tabelle III.

Begun.

Datum	CO_2 einer Atmosphäre %	O einer Atmosphäre %	Harnmenge ccm	N pro die g	NH_3 pro die g	N (NH_3) in % des N	P_2O_5 pro die g	Cl pro die g	Acidität in ccm $^n/_{10}$-NaOH pro die	Kreatinin pro die g	Zugeführte Salzsäure ccm
16. III.	5,99	5,44	860	13,11	0,92	5,85	1,84	4,73	404,2	1,44	—
17.	6,10	5,52	1150	13,52	0,93	5,71	1,95	4,03	402,5	1,45	—
18.	5,92	4,36	1045	13,89	0,91	5,39	1,98	4,10	407,5	1,45	—
Mittel	6,00	5,10	1018	13,50	0,92	5,65	1,92	4,28	404,7	1,44	—
19. III.	5,99	4,86	1265	12,75	1,24	8,00	2,02	6,29	480,7	1,41	25
20.	6,02	5,37	1180	13,38	1,52	9,44	2,21	9,20	566,4	1,59	30
21.	5,95	5,86	1010	14,84	2,03	11,30	2,24	8,28	656,5	1,49	30
Mittel	5,98	5,36	1151	13,65	1,59	9,58	2,15	7,92	567,8	1,49	—
22. III.	6,02	5,06	810	12,84	1,59	10,22	1,84	6,07	469,8	1,52	—
23.	5,91	4,48	780	12,98	1,42	9,00	1,93	6,24	445,6	1,49	—
24.	5,99	5,39	840	14,37	1,07	6,08	2,00	5,36	428,2	1,71	—

beide Herren ziemlich stark saure Nahrung zu sich nahmen. Im übrigen sind die absolut ausgeschiedenen Mengen von 0,76 bzw. 0,92 NH_3 normale Tagesmengen.

Die Acidität des Harns bewegte sich in beiden Fällen zwischen 404,7 und 459 ccm $^n/_{10}$-NaOH, und die Kreatininausscheidung betrug durchschnittlich 1,43 bis 1,44 g für den Tag.

Was die Kohlensäurespannung des venösen Blutes betrifft, so war dieselbe in beiden Fällen annähernd gleich, bei Herrn H. 6,08 %, bei Herrn B. 6,00 % einer Atmosphäre.

Nun nahm Herr H. 170 ccm, Herr B. 85 ccm einer 12 % Cl enthaltenden Salzsäure zu sich. Und der Erfolg?

Sowie Salzsäure genommen wird, sehen wir in beiden Fällen ganz gleichmäßig ein bedeutendes Ansteigen des Ammoniakgehaltes des Harns und eine entsprechende Steigerung der Chlorausscheidung, eine ganz geringe Vermehrung der Phosphorsäure- und Kreatininausscheidung und eine bedeutende Steigerung der titrimetrischen Acidität des Harnes.

Während der Periode der Salzsäure sehen wir die Stickstoffausscheidung im Falle H. um 10 %, im Falle B. um 1 %, in letzterem Falle also, wie bereits erwähnt, fast unverändert. Die Ammoniaksteigerung im Falle H. beträgt in der Salzsäureperiode 71 %, im Falle B. 69,5 %. Die Chlorausscheidung

steigt im Falle H. um 48 %, im Falle B. um 85 %, während die Phosphorsäureausscheidung im Falle H. um 14 %, im Falle B. um 12 % gegen die Vorperiode gesteigert erscheint.

Die Kohlensäurespannung beträgt dagegen in der Salzsäureperiode im Falle H. 98,5 %, im Falle B. sogar 99,6 % der Vorperiode, ist also um so geringe Werte verschieden, daß wir von einem vollkommenen Gleichbleiben sprechen können, d. h. die Kohlensäurespannung bleibt in beiden Fällen vollkommen unbeeinflußt durch die Säurezufuhr.

Nach Aussetzen der Salzsäurezufuhr bleibt in beiden Fällen die Ammoniakausscheidung noch 2 bis 3 Tage etwas erhöht, ebenso noch die Chlorausscheidung; beide sinken aber deutlich zu normalen Verhältnissen ab, so daß bei Herrn H. die Ammoniakausscheidung am 3. Tage 4 %, bei Herrn B. noch 6 % beträgt und auch die Chlorausscheidung in beiden Fällen leicht gesteigert erscheint.

Die beiden Versuche sind also ganz eindeutig und schlagend ausgefallen; sie zeigen, daß in den menschlichen Körper eingeführte Salzsäure durch Ammoniak neutralisiert wird; eine Änderung der Kohlensäurespannung im venösen Blute tritt nicht ein.

Und nun gehen wir an die Erledigung der Frage:

IV. Kann verminderte Kohlensäurespannung als Maß der Acidosis beansprucht werden?

Diese Frage wurde bereits in der gleichen Weise von Michaelis (l. c. S. 97) aufgeworfen und dahin beantwortet, daß verminderte Kohlensäurespannung nur dann als Kriterium einer Acidosis gelten kann, „wenn neben der Verminderung der CO_2-Spannung die $[H^{\cdot}]$ des Blutes die normale ist.“

Dies geht aus dem von Michaelis für die $[H^{\cdot}]$ des Blutes gegebenen Ausdrucke

$$[H^{\cdot}] = k_{CO_2} \cdot \frac{(CO_2)}{(NaHCO_3)}$$

hervor.

Denn wenn in diesem Ausdrucke die (CO_2) kleiner wird — und eine solche Verminderung der CO_2-Spannung sehen ja Porges, Leimdorfer und Markovici als Zeichen der Acidosis an —, dann würde, falls $(NaHCO_3)$ unverändert bliebe, die $[H^{\cdot}]$ kleiner werden, d. h. das Blut alkalischer sein. Soll

also die Verringerung der CO_2-Spannung ein Zeichen der Säuerung darstellen, dann muß **mindestens** [H˙] gleich bleiben, d. h. die Bicarbonatgröße in gleicher Weise verringert sein wie die CO_2-Spannung.

Dies setzen also **Porges**, **Leimdörfer** und **Markovici** voraus! Aber einmal trifft diese Voraussetzung durchaus nicht immer zu, andererseits scheinen auch die bezüglich einer verminderten CO_2-Spannung gemachten Angaben der Autoren im Einzelfall nicht ganz sicher. Als Beweis sei einmal auf die Bestimmungen der genannten Autoren bei Schwangeren, andererseits auf die Angabe einer Verminderung der CO_2-Spannung bei Carcinomatösen hingewiesen.

Novak, **Leimdörfer** und **Porges**[1]) fanden bei Schwangeren eine Kohlensäurespannung von 5,36% gegenüber 5,81% der Norm, also eine Differenz um knapp 10%. Die genannten Autoren erschließen aus diesem Befund eine Acidosis bei Schwangeren.

Hierzu bemerkt **Michaelis** (l. c. S. 97) folgendes: „Ich hatte nun Gelegenheit, an zahlreichen Schwangeren die [H˙] des Blutes zu messen zu einer Zeit, wo ich diese Arbeiten (der genannten Autoren. Anm. d. A.) noch nicht kannte und deshalb ganz unbeeinflußt war. Es fand sich im Mittel, bei 18° gemessen, [H˙] $= 2{,}26 \cdot 10^{-8}$, während die zu gleicher Zeit vorgenommenen Kontrollmessungen an nicht schwangeren Frauen [H˙] $= 2{,}56 \cdot 10^{-8}$ im Mittel ergaben (s. Tabelle S. 102, 103) Die [H˙] bei Schwangeren ist also im Mittel um etwa 10% kleiner als in der Norm (**das Blut ist alkalischer**). Sind die Unterschiede auch klein, so ist es doch bemerkenswert, daß die [H˙] um ebensoviel vermindert ist wie die CO_2-Spannung; daher muß die Bicarbonatmenge des Schwangeren-Blutes die normale sein, und es kann keine Acidosis vorliegen."

Während in diesem Falle die Annahme nicht zutraf, daß die [H˙] stets ungeändert sei, ja die verminderte CO_2-Spannung nicht nur kein Zeichen der Acidosis darstellte, sondern im Gegenteil das Blut in Wirklichkeit relativ alkalischer war, hat für das Carcinom **Heim**[2]) die Angabe von **Porges** und seinen

[1]) **Novak**, **Leimdörfer** und **Porges**, Über die CO_2-Spannung des Blutes in der Gravidität. Zeitschr. f. klin. Med. 75, 301, 1902.

[2]) **Heim**, Studien über die Kohlensäurespannung des venösen Blutes. Ztschr. f. klin. Med. 78, 1913.

Mitarbeitern bezüglich Verminderung der CO_2-Spannung des venösen Blutes nicht bestätigen können.

Wir zweifeln nicht daran, daß auch für eine große Reihe von Krankheitszuständen, für die aus einer Verminderung der CO_2-Spannung auf Acidosis geschlossen wurde, das Unrichtige dieser Schlußfolgerung aus einem oder dem anderen Grunde erwiesen werden wird.

Münzer[1]) hat seine Ammoniakstudien mit dem Satze geschlossen, daß weder für das urämische noch für das cholämische Koma, noch auch für die Leukämie „eine Steigerung dieser normalen Säuerung bis zur toxischen Wirkung" nachzuweisen wäre.

Für die Urämie haben wohl Straub und Schlayer[2]) gleich Porges das Vorhandensein einer Säurevergiftung diskutiert, doch hat sich bereits Münzer[3]) auf Grund früherer Untersuchungen gegen diese Schlußfolgerung ausgesprochen.

„Nur beim Diabetes mellitus — sagt Münzer — findet man eine exzessive Säurebildung und muß die Möglichkeit einer Säurevergiftung zugegeben werden."

Daß im diabetischen Koma der Kohlensäuregehalt des venösen Blutes stark vermindert ist, wurde bereits vor langer Zeit durch Minkowski[4]), Wolpe[5]) und Kraus[6]) sichergestellt. Zur Erklärung dieses Befundes griffen die genannten Autoren

---

[1]) Münzer, Die Bedeutung der Ammoniaksalze für die Pathologie nebst einem Beitrage zum Stoffwechsel bei Leukämie. Prager med. Wochenschr. **22**, Nr. 15 bis 19, 1897.

[2]) Straub und Schlayer, Die Urämie eine Säurevergiftung? Münch. med. Wochenschr. **1912**, Nr. 11.

[3]) Münzer, Urämie und Harnstoffgehalt des Blutes. Prager med. Wochenschr. **37**, 1912. — Derselbe, Ein Fall von Morbus Addisonii mit besonderer Berücksichtigung der hämodynamischen Verhältnisse nebst Bemerkungen zur Lehre von der Acidose. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. **16**, 1914.

[4]) Minkowski, Über den CO_2-Gehalt des Blutes beim Diabetes mellitus und im Coma diabeticum. Mitteilg. aus der med. Klinik zu Königsberg **1888**.

[5]) Wolpe, Untersuchungen über die Oxybuttersäure des diabetischen Harns. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **21**, 138, 1886.

[6]) Kraus, Über die Alkalescenz des Blutes bei Krankheiten. Zeitschr. f. Heilkunde **10**, 1889. — Siehe auch: v. Jaksch, Über die Alkalescenz des Blutes bei Krankheiten. Zeitschr. f. klin. Med. **13**, 1888.

auf die von Schmiedeberg-Walter experimentell festgestellten Folgen der Säurevergiftung zurück. Daß der stark herabgesetzte CO_2-Gehalt des venösen Blutes unter normalen Verhältnissen zu verminderter CO_2-Spannung in den Alveolen führen muß, geht aus der Dissoziationskurve des Blutes klar hervor.

Nun kommen Porges, Leimdörfer und Markovici mit einer anderen Erklärung: Das Atemzentrum ist gegen Säuren besonders empfindlich. Kommt es zur Entwicklung abnormer Säuren, so bewirken diese durch Reizung des Atemzentrums eine Steigerung der Lungenventilation, es kommt zu vermehrter Abdunstung von Kohlensäure; „die vermehrte Ventilation setzt die Kohlensäurespannung des Blutes und damit seine Acidität herab" (l. c. S. 3). „Ähnlich wie die durch Sauerstoffmangel gebildeten Säuren muß nun jede Acidosis zu einer Überventilation und herabgesetzter Kohlensäurespannung führen" (l. c. S. 5).

Gegenüber dieser Schlußfolgerung ist zu betonen, daß die Säuren nicht als solche, sondern als Salze, und zwar — wie wir in Übertragung unserer Versuche auf die menschliche Pathologie sagen dürfen — als Ammonsalze im Körper kreisen.

Gleichwie in unserem Versuche sehen wir auch in der menschlichen Pathologie, sobald es zur gesteigerten Entwicklung von Säuren kommt (wir verweisen auf die Phosphorvergiftung, beginnenden schweren Diabetes mellitus), eine entsprechende Steigerung des Ammoniakgehaltes des Harnes. Die Säuren werden zunächst durch Ammoniak neutralisiert.

Da ist doch wohl der Schluß berechtigt, daß ebensowenig wie in unseren Versuchen von experimenteller Säurezufuhr beim Menschen eine Änderung der Kohlensäurespannung eintrat, ebensowenig eine solche beim Diabetes mellitus im Beginn der Erkrankung trotz ausgesprochener Säuerung nachweisbar sein dürfte. Erst bei andauernder hochgradiger Säuerung (wie sie ja für den Diabetes mellitus als tatsächlich vorhanden erwiesen wurde) kommt es, wie wir in Übereinstimmung mit Schmiedeberg-Walter einerseits, Kraus-Minkowski andererseits annehmen, aus den eingangs (S. 258) festgestellten Ursachen zur ständig fortschreitenden Verminderung des Kohlensäuregehaltes des venösen Blutes bzw. zur entsprechenden Herabsetzung der Kohlensäurespannung der Luft in den Alveolen.

Den endgültigen Beweis in dieser Richtung werden Versuche bezüglich der Bindungsfähigkeit des Blutes Diabetischer gegenüber CO_2 erbringen, deren Durchführung wir uns vorbehalten.

Auf die Bedeutung solcher Versuche hat bereits Münzer (l. c. S. 265 Nr. 3) und unabhängig von diesem Autor und gleichzeitig Morawitz und Walker[1]) hingewiesen.

Wir schließen unsere Ausführungen mit folgenden Sätzen:

1. Experiment und Klinik lehren, daß Säuren, sei es, daß dieselben experimenti causa in den menschlichen Organismus eingeführt werden, sei es, daß sie in demselben pathogen entstehen, zunächst durch Ammoniak neutralisiert und als Ammoniaksalze mit dem Harne ausgeschieden werden.

Ammoniak ist ein Säureindicator (Hallervorden, Münzer).

2. Eine Änderung der Kohlensäurespannung des venösen Blutes tritt hierbei zunächst nicht ein, und so kann die Kohlensäurespannung auch nicht als Maß der Acidosis dienen.

3. Verminderte Kohlensäurespannung ist „nicht ohne gleichzeitige Kontrolle der anderen Faktoren eo ipso" (Michaelis S. 98) als Maß der Acidosis zu deuten.

4. Der Kohlensäuregehalt des venösen Blutes sinkt erst bei andauernder Acidosis infolge der schließlich eintretenden Verarmung des Blutes an Kohlensäurebindern, vielleicht auch infolge der Gewebsalteration; ob und inwieweit die Atmung dabei beteiligt ist, müssen weitere Untersuchungen lehren.

5. Die Kohlensäurespannung der mit dem venösen Blute im Ausgleich stehenden Alveolarluft ist in erster Linie abhängig vom Kohlensäuregehalt dieses Blutes und insofern wahrscheinlich eine Funktion der Bindungsfähigkeit des Blutes für Kohlensäure.

6. Die Kohlensäurespannung des venösen Blutes kann auch ohne jede Säuerung sinken; in welchem Ausmaße und für welche Zeitdauer, müssen weitere Versuche lehren.

---

[1]) P. Morawitz und J. Chandler Walker, Über ein tonometrisches Verfahren zur Bestimmung des Gleichgewichtes zwischen Säuren und Basen im Organismus. Diese Zeitschr. **60**, 395, 1914.

Einfluß der Nahrung und der Bewegung auf den Blutzucker.

Von

W. von Moraczewski.

(Aus dem chemischen Laboratorium der medizinschen Klinik in Zürich.)

(Eingegangen am 30. Juni 1916.)

Wir haben in der folgenden Versuchsreihe die Blutzuckervermehrung unter dem Einflusse der Nahrung und unter dem Einflusse der Muskelarbeit näher untersucht, da in den bis jetzt vorliegenden Arbeiten noch manches Zweifelhafte herrscht, das durch Serienversuche eher eine Deutung erhalten dürfte.

Wenn wir nämlich Kohlenhydrate zur Nahrung zusetzen, so haben wir nicht immer eine Blutzuckervermehrung zu erwarten. Zuweilen tritt eine solche auch bei reichlicher Kohlenhydratnahrung nicht ein (J. Bang). Dagegen sehen wir oft bei geringem Kohlenhydratzusatz Glykämie und Glucosurie auftreten. Es wird mit Recht behauptet, daß eine ausgehungerte Leber die Glykogenbildung „verlernt" hat, und daß hungernde Tiere eher zur Glucosurie und Glykämie neigen als gut genährte.

Wir müssen somit zweierlei unterscheiden. Die Vermehrung des Blutzuckers unter Einfluß der übereichlichen Kohlenhydratnahrung und die Vermehrung unter dem Einfluß der mangelhaften Glykogensynthese.

Es kann eine Glykämie auftreten, wenn die ausgehungerte Leber schlecht assimiliert. Es muß dann keine überaus große Kohlenhydratmenge gereicht werden, um Glykämie nnd Glucosurie hervorzurufen. Das ist der Fall bei hungernden Kaninchen, die bei massigem Zuckerzusatz glukosurisch werden. — Es könnte aber auch bei wohlgenährten Kaninchen lediglich durch Zuckerzusatz Glykämie auftreten, nur müßte hier die gereichte Zuckermenge größer sein. — Überhaupt ist also die Glykämie von der Menge des gereichten Zuckers nicht direkt abhängig.

Es ist aber auch die Glucosurie von der Blutzuckermenge nicht direkt abhängig, denn es kann der Blutzucker erhöht werden, ohne daß es zur Glucosurie kommt, z. B. im Fieber, und was noch wichtiger ist, es kann trotz der Erhöhung des Blutzuckers in Fieber die Toleranz für Kohlenhydrate hoch bleiben — vielleicht sogar erhöht werden. Wir müssen uns also denken, daß hier der im Blute kreisende Zucker viel rascher als sonst verschwindet und sogar eine Erhöhung desselben von keiner Zuckerausscheidung gefolgt wird.

Das eben Gesagte rechtfertigt jede weitere Untersuchung dieser so verwickelten Vorgänge. —

Wir haben uns vorgenommen: 1. den Einfluß der verschiedenen Nahrungsarten: Eiweiß, Fett, Kohlenhydrate, Gelatine bei ausgehungertem Individuum zu studieren. 2. Denselben Einfluß bei guter Ernährung zu verfolgen. 3. Den Einfluß der Muskelbewegung bei verschiedenen Nahrungsarten zu untersuchen.

Methoden.

Der Blutzucker wurde nach der Bangschen Methode, die zu Serienversuchen besonders bequem erscheint, bestimmt. Dabei wurden kleine Modifikationen gemacht, die kurz erwähnt werden sollen. Statt 0,1 wurde 0,2 Blut in ein dickes Filtrierpapier aufgesaugt. Diese Menge kann auf einer chemischen Wage fast ganz genau und regelmäßig eingehalten werden. — Die Diffusion des Zuckers dauerte nicht $^1/_2$ Stunde, sondern mindestens 1 bis 2 Stunden, da wir uns überzeugt haben, daß $^1/_2$ Stunde nicht immer ausreicht. — Die Diffusion geschah in einer Temperatur von 40 bis 60^0, indem die mit Blut und Kaliumchloridlösung beschickten Gläser in warmem Wasser von 40^0 verblieben. — Die Lösung wurde stets filtriert wobei das Löschpapier sowie das Filtrierpapier (beides zuckerfrei gewaschen und ausgekocht) zwischen den Fingern ausgepreßt wurde. — Es wurden ohne Ausnahme drei Proben in Arbeit genommen, die meistens genau stimmten; sollte eine abweichen, so wurde sie außer acht gelassen. — Drei Umstände mögen nochmals als wichtig hervorgehoben werden: das Kochen darf nicht länger währen als 2 Minuten; der Verschluß muß sicher sein, damit die Luft nach der Kupferreduktion nicht

eindringe[1]), die Jodlösung muß frisch bereitet sein und darf nicht länger als 3 Tage benutzt werden.

Neben der Blutbestimmung haben wir den Harn untersucht und zwar auf seinen Gehalt an Harnsäure, Indican und auf seine Oxydationsfähigkeit. Zu diesem Ende wurden 10 ccm Harn ohne Entfärbung nach Zusatz von Phosphorsäure oder von Natronlauge mit $^{n}/_{100}$-Permanganatlösung filtriert; weitere 10 ccm wurden mit Tierkohle entfärbt und ebenfalls in saurer und alkalischer Lösung mit $^{n}/_{100}$-$KMnO_4$ titriert. — 5 ccm mit Tierkohle entfärbten Harnes wurden mit 5 ccm Natronlauge versetzt und in der Siedehitze mit 1 $^{0}/_{00}$ Methylenblaulösung bis zur beginnenden Blaufärbung tropfenweise versetzt. Es sollte die Methylenblau-Entfärbung über etwaige Harnreduktion Aufschluß geben. Der Harn wurde von 6 Uhr früh bis 10 Uhr früh gesammelt und nur diese Menge wurde berücksichtigt.

Das Blut wurde 1 Stunde nach dem Frühstück um 8 Uhr früh untersucht. Am dritten Tage jeder Periode wurde das Blut nüchtern untersucht.

Das Versuchsobjekt, völlig gesund, wurde auf eine konstante Diät gesetzt, die aus 1500 g Kartoffel pro Tag bestand. Nach 3 Tagen, wobei am dritten Tage das Blut, wie oben gesagt, nüchtern entnommen wurde — wurde zu der Portion Kartoffeln 56 bis 60 g Fett zugesetzt, dieses während 3 Tagen beobachtet, am dritten Tage ebenfalls nüchtern das Blut untersucht und so weiter fortgesetzt, indem immer Perioden von 3 Tagen mit Kohlenhydratzusatz, Eiweißzusatz, Gelatine, Lävulose usw. gemacht wurden.

I.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle I zusammengestellt und bieten folgendes Bild. Der Blutzucker, der während der Hungerperiode etwa 0,053 bis 0,061 $^{0}/_{0}$ betrug, steigt bei Fettzusatz um ein geringes, aber, nüchtern untersucht, zeigt er denselben Wert, wie in der Hungerperiode 0,053 $^{0}/_{0}$. — Ein Zusatz von 100 g Gelatine erhöht den Blutzucker auf das Doppelte; dieser Einfluß, bereits von Claude Bernard[2]) beobachtet, scheint nicht von Dauer zu sein, und wird mit jedem Tage geringer —

[1]) Die Kohlensäuredurchleitung haben wir in der dritten Versuchsreihe ganz unterlassen.

[2]) Leçons de physiol. exper. 1, 146.

Tabelle I.

	Blutzucker	Harnmenge von 6 bis 10 Uhr i. M.	Reduktion von Methylenblau in ccm	gefärbt		entfärbt		Stickstoff des Harnes	Harnsäure	Indican
				$KMnO_4$ in saurer Lösung	$KMnO_4$ in alkal. Lösung	$KMnO_4$ in saurer Lösung	$KMnO_4$ in alkal. Lösung			
1500 g Kartoffel	0,076	150	240	120	115	15	7	1,38	—	0,0045
	0,069	200	240	120	40	40	10	1,37	0,089	0,0012
	0,053	280	252	103	36	28	8	1,25	—	0,0061
	0,061	180	152	152	21	21	7	1,03	—	0,0027
Blutzucker-Durchschn. u. Harn-Ausscheid. in 3 Tgn.	0,061	660	644	375	97	89	25	3,65	—	0,0100
1500 g Kartoffel u. 50 g Fett	0,073	180	126	93	21	18	7	1,01	0,079	0,0081
	0,070	180	176	117	14	25	7	1,11	0,067	0,0056
	0,050	180	460	84	16	20	12	0,78	0,068	0,0120
Blutzucker-Durchschn. u. Ausscheidung in 3 Tgn.	0,064	540	762	284	51	63	26	2,90	0,214	0,0257
1500 g Kartoffel und 100 g Gelatine	0,132	220	198	110	22	17	6	2,33	0,110	0,0066
	0,122	180	198	93	14	19	12	2,71	0,099	0,0016
	0,119	100	190	104	24	40	16	1,85	0,083	0,0032
Blutzucker-Durchschn. u. Harn-Ausscheid. in 3 Tgn.	0,124	500	586	307	60	76	34	6,89	0,283	0,0114
1500 g Kartoffel u. 100 g Rohrzucker	0,108	150	390	113	22	57	18	1,68	0,066	0,0010
	0,089	240	182	103	24	16	12	1,40	0,087	0,0036
	0,066	80	160	72	8	14	5	0,58	0,057	0,0024
Blutzucker-Durchschn. u. Harn-Ausscheidung	0,088	470	732	288	54	87	35	3,66	0,210	0,0070
1500 g Kartoffel 100 „ Eiweiß	0,073	150	129	93	12	12	3	1,35	0,072	0,0022
	0,095	180	144	122	21	27	9	1,54	0,079	0,0108
	0,084	150	141	114	12	13	4	1,55	0,079	0,0120
Blutzucker-Durchschn. u. Harn-Ausscheidung	0,084	480	414	329	45	52	16	4,44	0,230	0,0250
1500 g Kartoffel 100 „ Lävulose	0,088	120	127	81	14	72	6	1,036	0,066	0,0036
	0,098	120	216	96	15	14	7	0,777	0,066	0,0018
	0,058	80	67	96	6	8	4	0,537	0,059	0,0026
Blutzucker-Durchschn. u. Harn-Ausscheidung	0,081	320	410	273	35	29	17	2,350	0,171	0,0080

100 g Rohrzucker verursachen am ersten Tage eine bedeutende Steigung des Blutzuckerwertes, immerhin nicht so groß wie bei Gelatine; nüchtern untersucht, ist der Blutzucker ganz wenig größer als normal, etwa 0,066 statt 0,061 $^0/_0$. Der Einfluß von 100 g Eiweiß ist zwar am erstem Tage unbedeutend, steigt aber dann und bietet sogar in nüchternem Zustande eine der Norm gegenüber erhöhte Zahl 0,084 $^0/_0$. — Dagegen verursacht 100 g Lävulose eine geringere Vermehrung als der Rohrzucker und

im nüchternen Zustande ist das Blut nach 3 Tage Lävulosezusatz ebenso zuckerarm wie an den normalen Tagen.

Diese Resultate bestätigen zum Teil das von Th. B. Jacobson[1]) gefundene, daß nämlich die Zuckerarten den Blutzucker vermehren, Fett dagegen es nicht tue. Immerhin muß hervorgehoben werden, daß eine geringe Zuckervermehrung auch bei Fett eingetreten ist, daß besonders ein Zusatz von Eiweiß deutlich den Zucker in die Höhe treibt. Es mag sein, daß dieses nur bei Hunger zutrifft.

Ich will gleich hervorheben, daß man in dieser Versuchsreihe die Blutzuckerbewegung am einfachsten als Folgen der Ernährung deuten sollte. Wir haben hier kaum einen Grund, von Leberinsuffizienz und mangelhafter Glykogensynthese zu sprechen. Es scheint, daß bei ungenügender Ernährung sogar das Eiweiß den Blutzuckergehalt zu steigern vermag; auch das Fett tut es in ganz unbedeutendem Grade. Die Polysaccharide werden scheinbar schlechter verbraucht wie die Monosaccharide, denn Rohrzucker bewirkt am ersten Tage eine größere Steigerung als die Lävulose. Es wäre gezwungen, die Erhöhung bei Gelatine und Eiweiß als mangelhafte Glykogensynthese zu deuten.

Wenden wir uns zu den im Harne gewonnenen Werten, so finden wir, daß sowohl die Methylenblauwerte wie die Permanganatoxydation bei Fett und Gelatine höher ausfallen als bei Rohrzucker und Lävulose; besonders an den Tagen, wo der Harn wie das Blut nüchtern untersucht worden waren.

Wenn wir die Harnschlacken als Ausdruck einer Insuffizienz der Leber betrachten im Sinne der G. Rosenfeldschen Auffassung, so sind hier die Harnsäure, das Indican, die Oxydation und Reduktion — wenn Methylenblau davon als Ausdruck gelten darf — alle bei Fettnahrung erhöht und bei Lävulose gering, trotzdem der Blutzucker an diesen Tagen die gleichen Werte hat.

Der Eiweißzusatz steigert dauernd den Blutzucker und veranlaßt keine Schlackenerhöhung. Dieses will sagen, daß es die Leber „glykogenfähig“ [2]) macht. Und damit stimmt auch alles, was wir über Eiweißernährung wissen.

---

[1]) Th. B. Jacobsen, diese Zeitschr. 56, 471.

[2]) G. Rosenfeld, Berl. klin. Wochenschr. 1908.

Meine früheren Versuche[1]) mit Indoldarreichung bei verschiedenen Nahrungsarten, die mich zu diesen Versuchen anregten, zeigten deutlich, daß bei Fettnahrung die Toleranz für Indol geringer wird, wie bei Eiweiß und Kohlenhydraten.

Fassen wir nochmals die Ergebnisse der ersten Reihe zusammen, so dürfen wir sagen, daß wir bei mangelhafter Ernährung durch Zusatz von Kohlenhydraten eine geringe und vorübergehende Steigerung des Blutzuckers erreicht haben, durch Zusatz von Eiweiß und Gelatine eine gleiche, aber mehr andauernde Steigerung, bei Fett ließ sich so gut wie keine Steigerung des Blutzuckers erzwingen.

II.

Die zweite Versuchsreihe sollte über den Einfluß des Fettes, des Eiweißes usw. bei reichlicher Ernährung uns unterrichten. Bei reichlicher und gemischter Kost wurde an zwei bis drei Tagen bedeutend mehr an Fett, Zucker usw. gegessen und das Blut, wie früher, nach dem Frühstück untersucht; der Harn ebenso von 6 bis 10 Uhr früh gesammelt. Im Harne wurden die gleichen Zahlen notiert, nämlich: die Harnmenge, die Anzahl der Kubikzentimeter der Methylenblaulösung, die Permanganatzahlen, die Harnsäure, der Stickstoff und das Indican.

Die Tabelle II faßt die Resultate zusammen.

Wenn wir hier die Blutzuckerwerte betrachten, so finden wir den Normalwert auf 0,070 bis 0,080 erhöht. Da es sich um dasselbe Individuum handelte und die Versuche unmittelbar aufeinander folgten, so muß hier der Blutzucker als Zeichen einer besseren Ernährung gelten (wenn man ihn nicht als Zeichen eines Überschusses von in der Leber nicht verwertbaren Zuckers deuten will). Jedenfalls sehen wir aus der Tabelle, daß der Traubenzucker, der Rohrzucker und besonders die Stärke durchaus nicht den Blutzucker beeinflussen und nicht nur keine deutliche Steigerung, sondern eher eine Herabsetzung der Blutzuckerwerte bewirken. — Der Normalwert ist am Anfange der Versuche 0,07 bis 0,08 — am Ende 0,096. — Man darf also die Zahlen, die wir an den Zuckertagen treffen, 0,098, 0,094, 0,086, 0,085, 0,083, kaum als eine Vermehrung

[1]) W. Moraczewski, Sulla relatione de l'indolo etc. Arch. d. fisiol. e pathol., Palermo 1908.

Tabelle II.

	Blutzucker nach dem Frühstück 8 Uhr	Harnmenge von 6 Uhr bis 10 Uhr	Reduktion mit Methylenblau in ccm	gefärbt: $KMnO_4$ in saurer Lösung	gefärbt: $KMnO_4$ in alkal. Lösung	entfärbt: $KMnO_4$ in saurer Lösung	entfärbt: $KMnO_4$ in alkal. Lösung	Stickstoff des Harnes 6 bis 10	Harnsäure	Indican
Gemischte Kost	0,056	110	246	113	44	14	10	1,63	0,097	0,026
„ (Durchfall)	0,071	130	104	54	14	6,5	2,6	1,57	0,080	0,017
Inanition	0,085	90	262	77	18	30,6	9,0	0,99	0,039	0,011
Gemischte Kost	0,091	130	338	88	17	19	6,5	1,78	0,094	0,013
„ Ruhe . .	0,074	500	440	235	40	25	10	4,62	0,169	0,037
„ Bewegung	0,083	200	136	132	24	6	6	1,68	0,096	0,012
Gem. Kost u. 100 g Rohrz.	0,098	275	257	123	27	13	11	1,98	0,093	0,015
„ Bewegung . .	0,113	170	250	105	8	17	6	1,83	0,093	0,013
„ Ruhe	0,086	260	390	143	28	20	10	2,37	0,124	0,023
„ u. 100 g Gelatin.	0,102	275	357	123	30	13	8	2,99	0,091	0,009
„ „ „ „	0,121	475	285	109	17	14	14	3,21	0,091	0,003
„ „ „ Stärke	0,085	375	412	157	30	14	15	2,57	0,115	0,0019
„ „ „ „	0,083	400	384	132	40	22	12	2,29	0,105	0,0040
„ „ 200 g Gehirn	0,085	250	180	150	30	10	7	1,92	0,233	0,0090
„ „ „ „	0,085	290	214	130	20	9	8	1,98	0,169	0,0162
„ „ 100 g Caramel	0,085	210	377	107	21	12	8	1,47	0,092	0,002
„ „ „ „	0,102	290	230	140	30	52	14	1,76	0,102	0,010
„ „ „ „	0,098	160	179	96	19	8	6	1,16	0,070	0,014
„ „ 50 g Fett .	0,103	250	710	187	40	50	20	2,28	0,088	0,015
„ „ „ „	0,093	280	364	131	28	19	14	2,04	0,086	0,016
„ „ „ „	0,063	375	547	138	26	15	11	2,27	0,103	0,017
„ „ 60 g Alkohol	0,094	275	236	137	27	16	13	1,43	0,099	0,027
„ „ „ „	0,079	535	278	134	42	16	10	2,54	0,117	0,032
„ „ 100 g Eiweiß	0,091	310	340	173	31	18	9	3,47	0,150	0,028
„ „ „ „	0,102	375	262	150	30	11	7	3,04	0,082	0,015
„ „ „ Trau- benzucker	0,086	210	231	122	29	6	10	2,02	0,103	0,0046
	0,094	180	308	130	30	20	12	1,73	0,118	0,0135
Gemischte Kost	0,096	200	420	120	24	20	10	2,07	0,107	0,010
„	0,085	330	264	125	30	10	10	1,89	0,083	0,010
Gem. Kost m. 3 g Jodkali	0,080	250	325	—	25	—	7,5	1,58	—	0,006
„ „ „ „	0,088	185	370	—	20	—	7,4	1,43	—	0,0062
„	0,096	330	297	125	33	26	9,9	2,58	0,082	0,018
„ früh 6 bis 10h	0,098	380	304	152	38	19	11	2,31	0,085	0,034
„ Mittag 10 „ 2h	—	375	300	135	30	11	7,5	2,10	0,094	0,022
„ Abend 2 „ 9h	—	370	1258	307	85	55	25	3,10	0,162	0,012
„ nachts 9 „ 6h	—	560	1120	341	84	67	33	4,18	0,172	0,013
Durchschnittswerte.										
Bei Gem. Kost Bewegung	0,095	350	300	120	35	24	9	2,40	0,090	0,020
„ „ Ruhe . .	0,074	500	440	235	40	25	10	4,62	0,169	0,037
„ „ (Durchfall)	0,071	130	104	54	14	6,5	2,6	1,57	0,080	0,017
Hungertag	0,085	90	262	77	18	30	9	0,99	0,039	0,011
100 g Traubenzucker . .	0,090	190	270	125	29	13	11	1,80	0,110	0,008
100 g Rohrzucker Ruhe .	0,092	265	320	133	27	16	10	2,18	0,109	0,019
„ „ Bewegung	0,113	170	250	105	8	17	6	1,83	0,093	0,013
100 g Caramel	0,095	220	262	114	23	24	9	1,46	0,088	0,009
100 g Stärke	0,084	390	390	140	35	18	14	2,43	0,110	0,003
100 g Gelatine	0,111	375	320	116	24	14	11	3,11	0,091	0,006

Tabelle II (Fortsetzung).

	Blutzucker nach dem Frühstück 8 Uhr	Harnmenge von 6 Uhr bis 10 Uhr	Reduktion mit Methylenblau in ccm	gefärbt: $KMnO_4$ in saurer Lösung	gefärbt: $KMnO_4$ in alkal. Lösung	entfärbt: $KMnO_4$ in saurer Lösung	entfärbt: $KMnO_4$ in alkal. Lösung	Stickstoff des Harnes 6 bis 10	Harnsäure	Indican
100 g Eiweiß	0,096	340	300	161	30	15	8	3,25	0,120	0,022
100 g Nucleinhalt. Eiweiß	0,085	270	190	140	25	9	7	1,98	0,200	0,020
50 g Fett	0,086	301	540	150	31	28	15	2,20	0,090	0,016
60 g Alkohol	0,086	400	257	135	35	16	12	2,00	0,110	0,030
3 g Jodkali	0,084	220	350	—	22	—	7	1,50	—	0,006

auffassen. Auch das Eiweiß erzeugt in dieser Periode keine deutliche Vermehrung. Wir finden immerhin eine solche am zweiten Tage der Eiweißnahrung 0,102 und bei Gelatine 0,102, 0,112. Es will dieses sagen, daß bei Kohlenhydraten der Nahrungszucker besser assimiliert wird als bei Eiweiß, denn wir dürfen uns kaum das Resultat der Blutzuckererhöhung bei Eiweiß als eine bessere Ernährung deuten. Ich glaube eher bei diesen Zahlen die Vermutung aussprechen zu dürfen, daß hier die Glykämie ein Ausdruck der Leberinsuffizienz sein dürfte, denn wir sehen das Fett, das in der Hungerperiode keine Erhöhung des Blutzuckers bewirkte, hier eine Erhöhung hervorrufen, die allerdings am nächsten Tage verschwindet. Auch Eiweiß, das in der ersten Periode weniger als Rohrzucker den Blutzucker beeinflußt hatte, steigert ihn hier bedeutender. Alkohol, Caramel, Jodkali, das wir neben den Kohlenhydraten und Eiweiß gegeben haben, waren ohne Einfluß auf den Blutzucker.

Somit scheint bei Überernährung der Blutzucker einen konstanten Wert zu haben, der etwa wie der osmotische Druck konstant ist und auch nach reichlichem Kohlenhydratzusatz gleich bleibt. Auch jede andere Art von Nahrung vermag bei Überernährung nur vorübergehend den Blutzuckerspiegel zu ändern. Jedenfalls wirken Kohlenhydrate anders als Eiweiß: Es kann ein Blut, das 0,050 °/₀ Zucker enthält, einen Zusatz von 100 g Zucker täglich vertragen, und ebenso ein Blut, das 0,090 °/₀ Zucker enthält. Nur ist im ersten Falle die Schwankung am ersten Tage deutlich, am dritten nicht mehr zu sehen (vgl. Tabelle I), im zweiten Falle bei Überernährung ist die Schwankung auch am ersten Tage nicht sichtbar.

Nicht so das Eiweiß, das bei Hungernden den Blutzuckerspiegel dauernd hebt und der durch Eiweiß erzeugte Blutzuckerzuwachs verschwindet nicht wie bei Lävulose oder Stärke. Bei Überernährung kann das Eiweiß wie das Fett keinen Einfluß haben; hat er ihn, so ist er vielleicht eher der Ausdruck schlechter Assimilation.

Die Gelatine hält einen besonderen Platz, da sie bei jeder Ernährungsform den Blutzucker zu steigen vermag.

Was nun die Harnausscheidung angeht, so war sie im großen und ganzen in Übereinstimmung mit der früheren Beobachtung. So haben wir bei Fettagen die größten Werte für Harnsäure, Methylenblau und Permanganat. Auch die ersten Tage der kohlenhydratreichen Nahrung zeigen deutliche Vermehrung der Harnsäure, der Schlacken überhaupt, deutlicher, wie bei der ersten Periode. Es will dieses sagen, daß ein Zusatz von Kohlenhydraten bei Überernährung anders wirkt als bei Hunger, indem er hier ein deutliches Anwachsen der oxydablen Körper zur Folge hat.

In dieser Periode haben wir Gelegenheit gehabt, etwas zu beobachten, was der Gegenstand unseres Studiums in der nächsten Periode sein wird, nämlich den Einfluß der Muskelbewegung auf den Blutzucker. Bei gemischter Kost und bei Rohrzuckerzusatz sahen wir, daß eine Muskelarbeit, die nur auf der Arbeit der Armmuskeln beruhte (Fechten), eine deutliche Steigerung des Blutzuckers bewirkte, und zwar besonders deutlich bei Rohrzuckernahrung. Diese Bewegung setzte merkwürdigerweise alle Schlacken herunter und zwar bei jeder Art von Nahrung.

Wenn wir die zweite Periode kurz charakterisieren wollen, so sagen wir, daß bei Überernährung eine Stabilität der Blutzuckerwerte besonders auffällt, eine Stabilität, die durch Kohlenhydrate noch weniger gestört wird, als durch Eiweiß oder Fettzusatz.

III.

In der dritten Periode befaßten wir uns hauptsächlich mit dem Einfluß der Bewegung und der Toleranz des Organismus auf Rohrzuckerzusatz.

Die Nahrung wurde festgesetzt und bestand aus 2000 bis 2500 g Milch und 300 g Brot. Zu dieser Nahrung wurden bald 56 bis 60 g Fett, bald die calorisch äquivalente Menge

Eiweiß bzw. Gelatine während 4 Tagen zugesetzt. Zwei Tage von diesen Perioden wurde Ruhe beobachtet, zwei andere Tage wurden Märsche von 12 bis 14 km ausgeübt und zwar bei ziemlich warmem Wetter. Am Schlusse jeder Periode wurde nüchtern 200 g Rohrzucker gegessen und gleich danach etwa in einer Stunde die Blutuntersuchung und Harnuntersuchung gemacht.

Das Blut wurde stets um 7 Uhr morgens nüchtern und um 2 Uhr nachmittags, eine Stunde nach dem Essen, untersucht. An den Tagen, wo Rohrzucker genossen wurde, wurde noch eine dritte Blutuntersuchung um 9 Uhr vormittags vorgenommen. —

Bei der Besprechung der Ergebnisse werden wir zuerst den Einfluß der Nahrung, dann die Toleranz auf Rohrzucker, endlich den Einfluß der Bewegung ins Auge fassen.

Was nun den Einfluß der Nahrung betrifft, so haben wir im großen und ganzen die früher gewonnenen Resultate bestätigen können. Auch in dieser Periode war die Nahrung kaum ausreichend ($2^1/_2$ l Milch, 300 g Brot). Der Blutzuckerwert schwankte um 0,045 bis 0,050. Ein Zusatz von Stärke bewirkte eine Stunde nach dem Essen ein Ansteigen des Blutzuckers. Nüchtern blieb der Einfluß aus. Eiweißzusatz bewirkte wie in der ersten Versuchsreihe eine Zuckervermehrung, die sogar in den folgenden Tagen in der nüchtern untersuchten Portion zu finden war. Fett rief keine Blutzuckersteigerung weder nüchtern noch unmittelbar nach dem Essen hervor. Gelatine erzeugte diesmal keine hervorragende Wirkung. Überhaupt wurden hier dieselben Wirkungen auf den Blutzuckergehalt konstatiert, die wir in der ersten Versuchsreihe kennen gelernt haben — Kohlenhydrate riefen eine Blutzuckersteigerung, Fett eine geringe Wirkung hervor. Nur die Gelatine hatte hier keine so deutliche Blutzuckervermehrung zur Folge.

Am Schluß von jeder Periode wurden nüchtern 200 g Rohrzucker genommen. Diese Versuchsanordnung sollte Aufschluß geben, wie die vorhergehende Nahrungsweise auf die Toleranz einwirkt. Es hat sich nun herausgestellt, daß bei der ungegenügenden Standardkost eine geringe Steigerung des Blutzuckers auftritt, die etwa 2 Stunden anhält. Übt man aber Bewegung aus, so scheint die Toleranz größer zu werden, und

die gereichte Zuckermenge ruft auch bei dieser Ernährungsweise so gut wie keine Veränderung hervor.

Normale Kost	0,061 bis 0,085		nach 200 g Rohrzucker.
Bewegung bei normaler Kost	0,056 bis 0,061		
	7 Uhr fr.	9 Uhr fr.	

Die Toleranz bei Stärkenahrung gestaltet sich folgendermaßen:

bei Ruhe . . . . . 0,063 bis 0,061,
bei Bewegung . . . 0,074 bis 0,065.

Die geringe Differenz rührt von der Bewegung her, die, wie wir gleich sehen werden, den Blutzucker zu heben vermag. Es scheint bei Stärkenahrung wie bei gewöhnlicher Standardkost die Toleranz sehr groß zu sein, größer bei Stärke und Ruhe als bei Standardkost und Ruhe.

Nach einer 4tägigen Eiweißnahrung ruft 200 g Zucker keine bedeutende Blutzuckervermehrung hervor: 0,045 bis 0,064, obgleich der Harn eine geringe Reduktion, quantitativ nicht bestimmbar, zeigte.

Nach Fettnahrung zeigte das Blut das erste Mal eine deutliche Steigerung des Blutzuckers nach 200 g Rohrzucker, nämlich 0,085 bis 0,086, und der Harn reduzierte stark, dagegen das andere Mal nach vier Tagen Fettnahrung ergaben die 200 g Rohrzucker 0,025 bis 0,045 — also eine durchaus normale, eher eine subnormale Zahl.

Bei Gelatinenahrung waren die Blutzuckerwerte nach 200 g Rohrzucker 0,052 bis 0,045, also durchaus normal. Ebenso nach reichlichem Wassertrinken.

Es muß somit allgemein gesagt werden, daß die Toleranz am besten bei Kohlenhydratnahrung ausfällt, was auch die Arbeiten der v. Noordenschen Schule[1]) bei Diabetes erwiesen haben. Weiter muß betont werden, daß Eiweiß und Fett die Toleranz[2]) vermindern. Dieses tritt hier nicht mit voller Deutlichkeit auf, da hier die Ernährung eher unzureichend war, aber bei Überernährung wäre vielleicht der Einfluß des Zuckers

---

[1]) Zeitschr. f. klin. Med. **65**, **66**, **67**.

[2]) Es muß nochmals betont werden, daß eine Zuckerausscheidung durch den Harn trotz der geringen Blutzuckermenge möglich erscheint, so wie umgekehrt kein Harnzucker zu sehen ist trotz der Erhöhung des Blutzuckers.

deutlicher zu sehen. Schließlich sei hervorgehoben, daß die Bewegung die Toleranz zu vergrößern scheint, was auch deshalb plausibel ist, weil die Bewegung trotz der Erhöhung des Blutzuckers einen größeren Zuckerbedarf bietet, und damit ist zu erklären, daß im Fieber, trotz der Erhöhung des Blutzuckers, nach Zuckerdarreichung keine Glucosurie auftritt.

Den Einfluß der Bewegung haben wir an zwei Individuen studiert. Das erste diente in allen Versuchsreihen als Objekt, das zweite hat sich den Versuchen, betreffend Nahrungseinfluß und Bewegung, unterzogen. Es war das ein sonst gesunder Mann, der eine geringe Toleranz für Zucker hatte und eine gewisse Neigung zur Glucosurie zeigte. Es war uns dies um so mehr erwünscht, bei diesem Manne die Verhältnisse kennen zu lernen.

Der Einfluß der Bewegung gestaltete sich nun folgendermaßen: Bei jeder Nahrung zeigte sich eine kleine Steigerung des Blutzuckers durch Bewegung. Diese Steigerung war aber am deutlichsten da, wo die Ernährung reichlicher war. Am deutlichsten war sie bei Stärke, dann bei gemischter Kost, Eiweiß und Gelatine — weniger deutlich bei Fettnahrung und bei der Standardkost.

Das andere Individuum zeigte aber eine deutliche Steigerung bei jeder Kost, auch bei der Fettnahrung, und zudem war der Unterschied zwischen Ruhe und Bewegung bei ihm bedeutend größer. So war bei M. J. (leichte Neigung zu Diabetes) bei normaler Kost der Wert von 0,053 des Blutzuckers bei Bewegung auf 0,085 gestiegen, während er bei M. W. bei 0,060 verblieb. Bei Fettnahrung zeigt der Diabetiker (sit venia verbo) eine Steigerung von 0,050 auf 0,084 der Normale den Unterschied M. W. 0,053 bis 0,040 — eher eine Verminderung. Bei Eiweiß zeigt der Diabetiker den Zuwachs von 0,055 auf 0,082 Blutzucker, während der Normale von 0,043 auf 0,071 den Blutzucker vermehrt. Bei Stärke finden wir beim Diabetes einen Zuwachs von 0,079 auf 0,100 $^0/_0$ Blutzucker, während der Normale mit einer Steigerung von 0,074 auf 0,083 antwortet. Auch bei Überernährung zeigt der Normale bei gemischter Kost einen Zuwachs von 0,074 auf 0,091, bei zuckerreicher Kost einen solchen von 0,098 bis 0,113.

Dieses will sagen, daß die Bewegung den Zucker im Ge-

ganismus mobilisiert und daß dieser beim Normalen nur von dem Depot bei reichlicher Ernährung geschöpft werden kann, bei anderen auch ohne reichliche Ernährung aus Eiweiß vielleicht entsteht. Diese durch Bewegung bewirkte Blutzuckersteigerung ist der Fieberglykämie an die Seite zu stellen und beruht wohl auf einer Eiweißzersetzung oder sonstigem Mobilmachen der Zuckerquellen. Daß sie bei Individuen, die zur Glucosurie neigen, höher ist, gibt uns ein Mittel, die Neigung zu Diabetes zu erkennen und die Ursache des Diabetes näher zu präzisieren. Es ist ein leichteres Mobilmachen des Zuckers, eine leichtere Zuckersteigerung durch Bewegung für Diabetes charakteristisch. — Wir haben mit einem echten und sehr schweren Diabetes einen Versuch gemacht, der unsere Erfahrung vollauf bestätigte. Wir haben bei ziemlich strenger Kohlenhydratentziehung zwei Tage den Blutzucker bestimmt bei Ruhe und daran anschließenden zwei Tagen bei Bewegung. Hier die Resultate:

	Stunde der Blutentnahme	Blutzucker	Harnmenge	Harnzucker	Ammoniak	Harnsäure	Spez. Gew. des Harnes und Trockensubst. des Blutes	Aceton und Acetessigsäure
Bewegung . .	7 vm.	0,192	1300	37,7	2,87	0,221	1,028 (21,0 %)	viel
	12 m.	0,220	600	27,6	1,32	0,180	1,031 (21,6 %)	viel
Ruhe	7 vm.	0,184	1050	47,2	2,49	0,357	1,031 (21,9 %)	viel
	12 m.	0,202	500	—	—	—	—	viel
Bewegung . .	7 vm.	0,191	1050	44,6	3,92	0,420	1,036 (21,2 %)	viel
	12 m.	0,228	500	27,5	1,72	0,220	1,037 (20,5 %)	viel
Ruhe	7 vm.	0,162	1000	52,5	3,09	0,474	1,036 (20,2 %)	viel
	12 m.	0,162	600	27,6	1,42	0,201	1,030 (20,3 %)	—

Man sieht ohne weiteres, daß der Blutzucker bei Bewegung steigt und bei Ruhe fällt, man sieht aber weiter, daß der Harnzucker sich umgekehrt verhält. Er fällt bei Bewegung und wird bei Ruhe größer. Mit dem Harnzucker steigt bei Ruhe die ausgeschiedene Harnsäure, es fällt dagegen das Ammoniak. Bei Bewegung wird also trotz Vermehrung des Blut-

zuckers die Zuckerausscheidung geringer, was darauf deutet, daß mit der Mobilmachung auch die Blutzuckerverwertung steigt. Ebenso wie bei Fieber und bei Muskelarbeit der Gesunden.

Auch ein völlig Gesunder kann durch anstrengende Bewegung den Blutzucker zum Steigen bringen. Die Quelle dieses Zuckers ist die Nahrung, wie folgender Versuch zeigt. Es wurde der Blutzucker bei einem Gesunden an vier nacheinander folgenden Tagen bestimmt und zwar am ersten Tage 200 g Rohrzucker während eines 2stündigen Marsches verzehrt. — Am anderen Tage wurden die 200 g Rohrzucker verzehrt und dabei strenge Ruhe beobachtet. Am dritten Tage wurde bei völlig leerem Magen Ruhe beobachtet. Am vierten Tage wurde, ohne jede Nahrung zu sich zu nehmen, ein 2stündiger Marsch gemacht. Es ergab sich folgendes:

I.	7 Uhr	vm.	0,043	18,3	200 g Rohrzucker
	12 „	m.	0,080	19,0	viel Bewegung
II.	7 „	vm.	0,045	18,3	200 g Rohrzucker
	12 „	m.	0,055	20,0	vollkommene Ruhe
III.	7 „	vm.	0,047	18,5	Hunger — Ruhe
	12 „	m.	0,045	20,0	—
IV.	7 „	vm.	0,047	19,1	Hunger — Bewegung
	12 „	m.	0,052	30,1	—

Man sieht, daß sogar ein hungernder Organismus den Blutzucker durch Bewegung steigern kann, nur ist hier die Steigerung unbedeutend: von 0,047 auf 0,052 %. Es ist eben das Glykogen — wenn wir es schematisch ausdrücken wollen — schwer beweglich. Verfügt aber der Organismus über Nahrungszucker bei reichlicher Zufuhr von Kohlenhydraten, dann ist die Steigerung durch Bewegung ganz bedeutend, von 0,047 auf 0,080 %. Beim Diabetiker ist aber das Glykogen viel eher beweglich, er braucht keine Kohlenhydrate, um den Blutzucker zu steigern, er steigert ihn sowohl bei Fettnahrung wie auch bei Hunger.

Andererseits lehrt dieser kleine Versuch, daß ein Gesunder ganz bedeutende Mengen von Nahrungszucker aufspeichern kann, ohne den Blutzucker zu erhöhen, wenn er Ruhe beobachtet. Es erhöht sich der Blutzucker um ein geringes, von 0,045 bis 0,055 (zweiter Tag). Hungert ein Gesunder und be-

Tabelle III.

Datum	Stunde der Blutentnahme	Normale Diät. 2500 g Milch. 300 g Brot: Blutzucker	Feste Stoffe des Blutes %	Harnmenge	Spez. Gewicht	Harnstoff	Ammoniak	Harnsäure	Verhalten. Diät.
27. IV.	6	0,055	—	—	—	—	—	—	
	10	0,065	—	1150	1025	—	2,590	1,721	Ruhe. Normale Kost.
	2	0,091	—	—	—	—	—	—	„ „ „
28. IV.	7	0,075	—	1360	1022	—	2,907	0,700	„ „ „
	4	0,063	—	—	—	—	—	—	„ „ „
29. IV.	7	0,048	19,0	900	1011	—	1,377	0,189	„ „ „
	2	0,070	20,0	970	1014	—	1,484	0,325	„ „ „
30. IV.	7	0,034	21,1	750	1015	—	1,275	0,255	„ „ „
	2	0,071	20,0	600	1022	—	0,816	0,402	„ „ „
1. V.	7	0,060	18,0	650	1016	—	0,884	0,225	200 g Rohrzucker.
	9	0,085	—	—	—	—	—	—	
	2	0,055	19,5	900	1019	—	1,020	0,366	
		0,060	—	6980 4470	—	—	12,353 6,856	3,183 1,762	Summe der 3 Tage.
2. V.	7	0,054	19,0	400	1027	—	0,884	0,296	Viel Bewegung.
	2	0,057	19,8	400	1028	—	0,748	0,364	Normale Kost.
3. V.	7	0,062	19,8	330	1032	—	1,009	0,234	
	2	0,072	18,5	350	1031	—	0,969	0,294	
4. V.	7	0,056	19,0	420	1028	15,60	0,882	0,336	200 g Rohrzucker.
	9	0,061	18,0	—	—	—	—	—	
	2	0,072	20,0	350	1029	11,20	0,805	0,354	
		0,060		2250	—	—	5,297	1,878	Summe der 3 Tage.
5. V.	7	0,057	19,5	520	1028	14,00	0,707	0,348	Normale Kost und
	2	0,083	18,0	760	1020	10,66	0,468	0,304	**100 g Stärke.**
6. V.	7	0,070	18,5	700	1017	8,19	0,812	0,235	Ruhe.
	2	0,085	18,6	700	1018	7,21	0,525	0,117	
7. V.	7	0,063	17,4	1000	1011	5,61	0,935	0,367	100 g Rohrzucker.
	9	0,061	17,4	—	—	—	—	—	
	2	0,090	16,0	600	1022	6,93	0,492	0,335	
		0,074	—	4380 3100	—	42,60 27,94	3,939 2,764	1,706 1,054	Summe der 2 Tage.
8. V.	7	0,074	18,4	750	1017	10,60	0,765	0,302	Normale Kost. **100 g**
	2	0,091	17,7	600	1021	9,62	0,408	0,318	**Stärke.** Bewegung.
9. V.	7	0,074	18,0	350	1030	9,55	0,535	0,235	200 g Rohrzucker.
	9	0,065	17,1	—	—	—	—	—	
	2	0,066	18,0	300	1033	10,41	0,367	0,252	
		0,083	—	2000	—	40,18	2,075	1,107	Summe der 2 Tage.
10. V.	7	0,054	17,0	450	1029	15,51	0,688	0,301	Normale Kost.
	2	0,052	17,5	370	1027	10,48	0,503	0,294	**50 g Fett.** Bewe-
11. V.	7	0,057	18,6	410	1029	13,69	0,766	0,234	gung.
	2	0,052	17,0	430	1027	9,93	0,641	0,259	
		0,053	—	1660	—	49,61	2,598	1,088	

Tabelle III (Fortsetzung).

Datum	Stunde der Blutentnahme	Normale Diät. 2500 g Milch. 300 g Brot							Verhalten. Diät.
		Blutzucker	Feste Stoffe des Blutes %	Harnmenge	Spez. Gewicht	Harnstoff	Ammoniak	Harnsäure	
12. V.	7	0,062	19,0	580	1021	11,89	0,592	0,234	Normale Kost.
	2	0,079	18,0	560	1021	8,62	0,571	0,282	**50 g Fett.** Ruhe.
13. V.	7	0,085	19,8	930	1012	11,95	0,474	0,186	200 g Rohrzucker.
	9	0,086	17,4	—	—	—	—	—	
	2	0,076	17,1	550	1025	7,04	0,374	0,295	
		0,070	—	2620	—	39,50	2,011	0,997	Summe der 2 Tage.
14. V.	7	0,066	19,1	1150	1015	14,72	0,703	0,308	Normale Kost und
	2	0,088	17,7	650	1019	8,13	0,663	0,327	**100 g Eiweiß.**
15. V.	7	0,084	19,0	750	1023	8,62	1,147	0,252	Bewegung.
	2	0,035	18,5	450	1027	5,17	0,688	0,378	
16. V.	7	0,034	20,0	900	1024	8,16	1,350	0,454	
	2	0,057	18,0	420	1027	15,62	0,583	0,169	
		0,071	—	4320	—	60,42	5,134	1,888	Summe der 2 Tage.
17. V.	7	0,085	19,6	750	1023	29,80	0,967	0,502	Normale Kost und
	2	0,043	19,0	460	1028	17,15	0,860	0,386	100 g Eiweiß.
18. V.	7	0,042	18,3	760	1026	31,20	1,421	0,459	Ruhe.
	2	0,044	19,0	550	1028	—	1,122	0,368	
19. V.	7	0,045	19,3	780	1022	—	1,193	0,413	200 g Rohrzucker.
	9	0,064	18,0	—	—	—	—	—	
	2	0,070	17,5	550	1028	—	1,234	0,332	
		0,043	—	3850	—	—	6,797	2,460	Summe der 2 Tage.
22. V.	7	0,048	17,0	450	1030	8,68	1,102	0,292	Normale Kost.
	2	0,088	18,0	440	1031	14,02	1,016	0,443	**Gelatine 100.**
23. V.	7	0,051	19,7	670	0025	22,24	1,025	0,408	Bewegung.
	2	0,076	18,5	860	1025	18,57	0,901	0,339	
		0,066	—	2420	—	63,51	4,044	1,482	Summe der 2 Tage.
24. V.	7	0,052	18,0	800	1026	23,60	1,006	0,376	Gelatine 100 g.
	2	0,061	19,0	640	0024	24,64	1,126	0,282	Ruhe.
25. V.	7	0,035	18,2	1100	0016	28,27	1,298	0,418	
	2	0,052	18,6	750	1018	18,30	1,275	0,302	
26. V.	7	0,052	18,3	1100	1018	25,45	1,122	0,294	200 g Rohrzucker.
	9	0,045	19,5	—	—	—	—	—	
	2	0,048	20,0	450	1026	11,56	0,918	0,301	
		0,048	—	3400	—	83,58	4,613	1,315	Summe von 2 Tagen.
27. V.	7	0,038	19,0	500	1028	16,71	0,935	0,335	Fett 50 g.
	2	0,038	18,2	320	1029	7,41	0,653	0,301	Ruhe.
28. V.	7	0,039	17,3	500	1030	16,72	1,020	0,420	
	2	0,046	18,5	300	1030	8,11	0,612	0,292	
		0,040	—	1620	—	48,95	3,220	1,348	Summe der 2 Tage.
29. V.	7	0,028	18,2	420	1031	13,48	0,928	0,271	Fett 50 g.
	2	0,045	20,3	330	1030	10,16	0,662	0,331	Bewegung.
30. V.	7	0,025	18,0	450	1031	14,44	0,949	0,378	200 g Rohrzucker.
	9	0,045	16,5	—	—	—	—	—	
	2	0,047	18,0	330	1032	7,63	0,505	0,288	
		0,038	—	1530	—	45,71	3,044	1,268	Summe der 2 Tage.

Tabelle III (Fortsetzung).

Datum	Stunde der Blutentnahme	Normale Diät. 2500 g Milch. 300 g Brot							Verhalten. Diät.
		Blut-zucker	Feste Stoffe des Blutes %	Harn-menge	Spez. Gewicht	Harnstoff	Ammo-niak	Harn-säure	
31. V.	7	0,037	19,8	530	1029	11,55	0,991	0,391	1000 g Wasser.
	2	0,045	20,1	450	1027	7,52	0,612	0,378	Bewegung.
1. VI.	7	0,031	20,0	1520	1010	15,65	1,489	0,407	1000 g Wasser.
	2	0,057	19,0	1030	1012	9,27	0,628	0,242	Ruhe.
2. VI.	7	0,056	18,2	1800	1010	11,57	0,918	0,369	„
	2	0,030	20,0	1120	1010	8,63	0,495	0,338	
3. VI.	7	0,035	18,0	1200	1012	13,87	0,816	0,322	1000 g Wasser.
	9	0,045	—	—	—	—	—	—	200 g Rohrzucker.
	2	0,050	—	—	—	—	—	—	
	2	**0,041**	—	980	—	19,07	1,603	0,769	Ausscheidung am Tage d. Bewegung.
		0,048	—	2850	—	24,92	2,117	0,659	Ausscheidung am Tage der Ruhe.
		0,043	—	2920	—	20,20	1,413	0,707	
		0,038	—	760	—	22,85	1,522	0,638	Bewegung } Fett.
		0,040	—	810	—	24,45	1,610	0,674	Ruhe } Fett.
		0,053	—	830	—	24,81	1,299	0,544	Bewegung } Fett.
		—	—	1310	—	19,75	1,005	0,498	Ruhe } Fett.
		0,074	—	1200	—	—	1,712	0,629	Bewegung } Eiweiß.
		0,043	—	1300	—	—	2,266	0,820	Ruhe } Eiweiß.
		0,084	—	1000	—	—	1,030	0,553	Bewegung } Stärke.
		0,074	—	1550	—	—	1,210	0,520	Ruhe } Stärke.
		0,060	—	750	—	—	1,799	0,626	Bewegung } Normal.
		0,060	—	1490	—	—	2,285	0,591	Ruhe } Normal.
		0,066	—	1210	—	31,80	2,022	0,992	Bewegung } Gelatine.
		0,048	—	1700	—	41,79	2,306	0,657	Ruhe } Gelatine.

obachtet er Ruhe, so wird seine Blutzuckermenge selbstverständlich konstant bleiben.

Wenn wir also nochmals unsere Beobachtungen, die den Einfluß der Bewegung betreffen, wiederholen dürfen, so ergibt sich, daß die Bewegung überhaupt den Blutzucker vermehrt, indem er sozusagen aus den Muskeln oder sonstigen leicht zugänglichen Depots ausgepreßt wird. Er wird wie beim Fieber mobil und deshalb wird wohl auch die Toleranz größer. Aller Zucker wird im Blute retiniert, wie etwa die Chloride beim Fieber und bei den Anämien. (Die Trockensubstanzbestimmung beweist indessen, daß es sich nicht um Wasserretention handelt.) Diese Erscheinung des Zuckermobilmachens oder der Prozeß des Hineinpressens des Zuckers in das Blut ist bei Normalen schwerer als bei Diabetikern, die sogar bei Hunger und bei

Fettnahrung viel mehr Zucker bewegen können, viel mehr Zucker in das Blut einsaugen.

Der Diabetiker vermag aber auch durch Kohlenhydrate viel eher den Blutzucker zu vermehren als der Normale; diese längst bekannte Tatsache findet in unseren Versuchen, an M. J. ausgeführt, die in der Tabelle IV enthalten sind, ihre Bestätigung. Der Blutzucker steigt dort durch Rohrzuckerzusatz von 0,053 auf 0,080; bei Stärkezusatz von 0,052 auf 0,080, während Fett und Eiweiß ihn unbeeinflußt läßt. Ich erinnere daran, daß der Gesunde im Falle einer Stärke- und Zuckernahrung eine Steigerung von 0,060 auf 0,070 aufweist. (Tabelle III.)

Es erübrigt noch, das Verhalten des Harnes bei den zwei letzten Versuchsserien zu besprechen. Wir haben sowohl bei Gesunden (Tabelle III), wie bei den zur Glucosurie Neigenden (Tabelle IV) die tägliche Harnmenge in zwei Portionen, 5 Uhr abends bis 6 Uhr morgens und 6 Uhr morgens bis 5 Uhr abends gesammelt und darin den Harnstoff, das Ammoniak, und die Harnsäure bestimmt. Abgesehen davon, daß die Nahrungsweise eine unbedeutende Änderung in der Ausscheidung dieser Körper brachte, ergab sich die überraschende Tatsache, daß die Bewegung bei Gesunden ein Steigen der Harnsäureausscheidung bewirkt und zwar ebenfalls meistens bei Kohlenhydratnahrung, bei Gelatine und bei gemischter Normalkost. Bei Fett- und Eiweißnahrung sehen wir nicht nur keine Steigerung, sondern sogar ein Herabsinken der ausgeschiedenen Harnsäure.

Es muß betont werden, daß die Bewegung die Harnausscheidung verminderte; trotz der geringen Harnmenge war die Harnsäuremenge groß. — Umgekehrt verhielt sich das Ammoniak, das gerade dort, wo die Harnsäure vergrößert war, geringer wurde und ebenfalls nur bei Kohlenhydraten, Gelatine und gemischter Kost diese Erscheinung zeigte, nicht bei Eiweißnahrung.

Bei Eiweiß- und Fettnahrung nimmt umgekehrt die Harnsäure und das Ammoniak bei Bewegung ab, bei Ruhe zu.

Bei dem zur Glucosurie Neigenden ist dieselbe Erscheinung zu sehen, nur nimmt hier auch bei Fettnahrung die Harnsäure zu, ganz entsprechend der Tatsache, daß auch der Blutzucker bei Fettnahrung mobil gemacht werden kann, während dies bei Gesunden nicht geschieht.

Tabelle IV. Fall M. J.

Datum	Stunde der Blutentnahme	Blutzucker	Feste Stoffe des Blutes %	Harnmenge	Spezifisches Gewicht	Harnstoff	Ammoniak	Harnsäure	Diät und Bemerkungen
28. IV.	9 vm.	0,061	—	125	1028	1,61	0,361	0,185	Normale Diät ent-
	3 nm.	0,102	—	800	1030	7,37	1,85	0,752	sprechend 2½ Liter
29. IV.	8 vm.	0,023	—	—	—	—	—	—	Milch u. 300 g Brot.
	3	0,045	—	330	1029	3,39	0,897	0,271	Ruhe.
30. IV.	8 vm.	0,085	—	750	1028	5,76	1,657	0,510	Bewegung.
	3	0,045	—	705	1017	4,50	1,071	0,280	Ruhe.
1. V.	8	0,057	20,0	410	1029	3,161	1,045	0,274	„
	3	0,045	18,0	320	1029	2,567	0,534	0,269	„
2. V.	8	0,053	21,0	460	1031	2,95	0,938	0,308	„
3. V.	8	0,090	19,5	430	1033	2,19	1,096	0,296	Norm. Diät mit 100 g
	3	0,077	21,0	250	1034	3,20	0,552	0,252	Rohrzucker.
4. V.	8	0,080	18,5	450	1034	11,55	1,147	0,333	Ruhe.
	3	0,070	20,5	370	1031	10,91	0,881	0,274	
		0,076	—	1070	—	—	2,580	0,859	Ruhe 1½ Tag.
5. V.	8	0,092	19,5	500	1033	14,14	1,275	0,300	Bewegung.
	3	0,097	20,0	410	1032	11,59	0,836	0,315	Norm. Diät m. 100 g
6. V.	8	0,095	19,8	400	1036	13,36	1,360	0,403	Rohrzucker.
	3	0,097	21,0	390	1031	9,52	0,862	0,234	
		0,096	—	1200	—	—	3,058	0,952	Bewegung 1½ Tag.
7. V.	8	0,062	18,2	240	1032	7,08	0,571	0,168	Ruhe } Norm. Diät
8. V.	8	0,120	18,0	450	1033	15,03	1,147	0,351	Beweg. } und 50 g
	3	0,085	18,8	300	1031	8,64	0,765	0,195	„ } Fett.
17. V.	8	0,055	18,8	500	1026	6,43	0,765	0,310	Ruhe.
	3	0,050	19,0	420	1026	8,11	0,928	0,213	„
18. V.	8	0,050	17,0	420	1026	7,61	0,756	0,252	„
	3	0,055	18,0	430	1028	8,25	0,023	0,266	„
19. V.	8	0,084	16,0	640	1025	11,61	0,761	0,320	Bewegung.
		0,096	—	1390	—	35,28	2,673	0,866	Bewegung 1½ Tag.
		0,052	—	1270	—	23,97	2,707	0,731	Ruhe 1½ Tag.
19. V.	3	0,094	18,0	430	1027	—	0,963	0,258	Ruhe. Normale Diät
20. V.	8	0,085	18,0	590	1025	—	0,702	0,289	und 100 g Stärke.
	3	0,060	18,4	450	1026	—	0,612	0,247	
		0,079	—	1470	—	—	2,277	0,794	1½ Tag Ruhe.
21. V.	8	0,090	18,0	530	1028	6,09	0,631	0,397	100 g Stärke.
	3	0,091	18,0	420	1026	8,06	0,499	0,216	Bewegung.
22. V.	8	0,095	18,1	550	1025	7,04	0,467	0,308	
	3	0,100	18,2	500	1026	7,70	0,680	0,290	
23. V.	8	0,107	18,3	610	1029	12,50	1,037	0,384	
		0,100	—	1660	—	—	2,184	0,989	1½ Tag Bewegung.

Tabelle IV. Fall M. J. (Fortsetzung).

Datum	Stunde der Blutentnahme	Blutzucker	Feste Stoffe des Blutes %	Harnmenge	Spezifisches Gewicht	Harnstoff	Ammoniak	Harnsäure	Diät mit Bemerkungen
23. V.	3	0,087	18,0	310	1029	7,56	0,685	0,201	Normale Diät und
24. V.	3 nm.	0,077	20,0	500	1029	11,57	0,680	0,310	100 g Fleisch.
25. V.	8	0,083	20,3	410	1032	10,41	0,906	0,274	Bewegung.
		0,082	—	1220	—	28,54	2,271	0,785	1½ Tag Bewegung.
25. V.	3	0,050	20,8	550	1032	11,23	1,072	0,385	Normale Diät und
26. V.	8	0,055	18,0	300	1030	8,87	0,775	0,252	100 g Fleisch.
	3	0,055	18,4	450	1032	11,34	1,071	0,360	Ruhe.
27. V.	8	0,065	19,0	300	1031	6,54	0,630	0,204	
		0,055	—	1200	—	31,44	2,918	0,997	1½ Tag Ruhe.
28. V.	8	0,045	19,3	—	—	—	—	—	
	3	0,070	17,4	500	1027	10,27	0,850	0,280	Normale Kost, 4 Glas
29. V.	8	0,065	17,3	480	1026	9,84	0,816	0,230	Mühlbr.
1. VI.	3	0,065	20,0	420	1030	9,70	1,020	0,243	Ruhe.
		0,067	—	1400	—	29,81	2,686	0,753	1½ Tag Ruhe.

Auch diese Harnsäurevermehrung spricht dafür, daß bei Diabetikern die Bewegung leichter zu einer Eiweißzersetzung führt, wenn man die Harnsäurevermehrung als Ausdruck der Eiweißzersetzung auffassen will.

Vielleicht schützt die reichliche Eiweißnahrung vor der Zersetzung oder bringt anderes Material — jedenfalls ist die Tatsache der verminderten Harnsäureausscheidung bei Eiweißnahrung, die wir in beiden Fällen übereinstimmend beobachtet haben, beachtenswert.

Die Bewegung bringt eine Verminderung des Ammoniakwertes mit sich und man dürfte diese Ammoniakverminderung als eine Säureverarmung des Organismus deuten. Diese Erscheinung ist bei dem zur Glucosurie Neigenden nicht beobachtet worden. Bei ihm ist Ammoniak mit der Harnsäure vermehrt, was wohl auf den veränderten Stoffwechsel beruhen wird. Auch der echte Diabetiker schied bei Ruhe mehr Harnsäure und weniger Ammoniak aus als bei Bewegung, wie der Normale bei Fleischnahrung.

Die ebengenannten Tatsachen mögen nur erwähnt werden. Eine richtige Deutung ist vorläufig nicht zu geben.

Zusammenfassung.

1. Es wurde der Einfluß der verschiedenen Nahrungsarten bei mangelhafter und überreichlicher Ernährung auf den Blutzuckergehalt studiert und gefunden, daß bei mangelhafter Ernährung die Kohlenhydrate vorübergehend den Blutzucker steigern, das Eiweiß aber dauernd, wenn auch geringer, den Blutzucker hebt. Bei Überernährung sind die Kohlenhydrate ohne Einfluß auf den Blutzucker, Eiweiß und Fett bewirken eine unbedeutende, aber anhaltendere Wirkung.

2. Es wurde der Einfluß der Bewegung auf den Blutzucker studiert und festgestellt, daß je nach der Nahrung der Blutzucker leichter vermehrt werden kann. So wird bei Kohlenhydrat- und Gelatinenahrung der Blutzucker durch Arbeit erhöht, bei Fleisch- und Fettnahrung weniger. Dieses gilt für Gesunde.

Bei Diabetikern und zur Glucosurie Neigenden ist sowohl die Erhöhung des Blutzuckers durch Nahrung wie durch Bewegung leichter, und es wirkt die Muskelarbeit bei jeder Nahrung, auch bei Fett, blutzuckersteigernd.

3. Die Toleranz auf Zucker wird durch Muskelarbeit erhöht, und es scheint sogar bei Diabetes trotz der Erhöhung des Blutzuckers die Muskelarbeit zur Verminderung der Zuckerausscheidung zu führen.

Diese Arbeit wurde in dem chemischen Laboratorium der Mediz. Klinik in Zürich begonnen und in dem priv. Laboratorium des Dr. J. Flaschen in Karlsbad zu Ende gebracht, und ich will an dieser Stelle dem Dr. J. Flaschen für seine ausgezeichnete Hilfe und die Freundlichkeit, mit der er mir das Laboratorium zur Verfügung stellte, bestens danken.

Das osmotische Gleichgewicht zwischen Blut, Milch und Galle.

Von

F. H. van der Laan.

(Aus dem Laboratorium der Stadt Utrecht für Nahrungsmittelkontrolle.)

(Eingegangen am 30. Juni 1915.)

Schon die ersten Untersucher, die nach den grundlegenden Arbeiten van't Hoffs die Kryoskopie zuerst auf Körperflüssigkeiten anwendeten, fanden, daß die Gefrierpunktdepressionen (Δ) von Milch und Blut sich ungefähr innerhalb derselben Grenzen bewegen. Dreser[1]) fand 1892, daß Δ bei Milch von Kühen zwischen 0,55° bis 0,57°, bei Blut von 0,58° bis 0,61° schwankte. Auch J. Winter[2]) beobachtete, daß Δ bei Milch und Blut bei allen von ihm untersuchten Tierarten, Rind, Ziege und Mensch, immer die gleiche war und stets zwischen 0,55° und 0,57° schwankte, woraus er folgerte, daß das Blutserum und die Milch äquimolekular seien und bei allen Tiersorten denselben konstanten Wert besitzen müssen. Die Behauptung Winters, daß Δ von reiner Kuhmilch sehr konstant sei, wurde bald von Bordas und Génin[3]) bestritten, die für Δ von reinen Milchproben viel weiter auseinanderliegende Werte, nämlich von 0,44° bis 0,56° fanden; später gaben sie jedoch an, den mit allen Korrektionen versehenen Gefrierpunkt von 11 garantiert reinen Milchproben zwischen viel engeren Grenzen, nämlich 0,512° und 0,529°, gefunden zu haben. Auch Beckmann[4]) und Hamburger[5]) fanden für Δ von reiner Kuhmilch sehr konstante

---

[1]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **29**, 305, 1892.

[2]) Bull. Soc. chim. de Paris 1895, Nr. 24. — Arch. de Phys. norm. et de Path. **1896**, 114.

[3]) Compt. rend. **123**, 425 und 1298.

[4]) Forschungsber. f. Lebensm. und Hygiene, **1**, 421, 1894.

[5]) Rec. Trav. Chim. des Pays-Bas **15**, 349, 1896.

Werte. Letzterer gibt an, daß mit Hilfe der Gefrierpunktbestimmung sehr kleine Verdünnungen (selbst von 3 %) leicht bestimmt werden konnten.

Die Frage, inwieweit der Mittelwert für Δ bei Milch von Rindern aus verschiedenen Gegenden derselbe wäre, konnte damals (1896) noch nicht mit Bestimmtheit beantwortet werden. Seitdem sind viele Δ-Bestimmungen gemacht worden, ohne daß indessen eine völlige Übereinstimmung über die Konstanz dieser Eigenschaft bei der Milch und über ihren Wert für die Bestimmung einer eventuellen Wasserverdünnung erreicht worden ist. Während z. B. die Bestimmung dieser Eigenschaft in der Milchkontrolle in den Niederlanden regelmäßig Anwendung findet und ihr zur Festellung einer Verfälschung durch Wasserzufügung der größte Wert beigemessen wird, spricht man ihr in Deutschland für praktische Zwecke so ziemlich allen Wert ab.

Es ist jedoch auffallend, daß eben die Untersucher, die diese Methode regelmäßig anwenden, ihren großen Wert einstimmig erkennen, und daß im allgemeinen diejenigen, die nur dann und wann Gefrierpunktbestimmungen machen, über ihren Wert für die Praxis der Milchkontrolle weniger günstig urteilen. Ich bin überzeugt, daß die Ursache dieser Meinungsdifferenzen in der großen Zahl der Fehlerquellen gesucht werden muß, die ihren Einfluß bei dieser Bestimmung geltend machen können. Diesem Umstande ist es auch zuzuschreiben, daß in der physiologischen Literatur viele Reihen von Gefrierpunkten von verschiedenen Körperflüssigkeiten, wie Blut, Galle und Milch, gefunden werden, die viel größere Differenzen aufweisen, als in Wirklichkeit vorkommen.

Durch die regelmäßige Anwendung der Gefrierpunktbestimmung in der Praxis der Milchuntersuchung während mehrerer Jahre wurde ich überzeugt, daß Δ sowohl bei Mischmilch wie bei Milch einzelner holländischer Kühe einen sehr konstanten Wert besitzt, der in den weitaus meisten Fällen zwischen 0,54° und 0,55°, ohne Ausnahme innerhalb 0,53° und 0,57° liegt. Zur Erklärung dieser Konstanz wurde schon durch die ersten Untersucher darauf hingewiesen, daß auch Δ beim Blutserum relativ konstant und von ungefähr derselben Größe ist als bei der Milch, woraus dann Winter den obengenannten Schluß zog. Nun ist jedoch das experimentelle Material, woraus

Winter diese Schlußfolgerung machte, nicht sehr groß, und richtig bemerkt Hamburger[1]), daß die Auffassung dieses Autors vielmehr ein Produkt der Intuition als dasjenige streng durchgeführter Experimente ist.

Hamburger hat l. c. die Ergebnisse der bei verschiedenen Tieren gefundenen Gefrierpunktbestimmungen in einer Tabelle zusammengestellt, woraus nichts weniger als die Gleichheit dieser Werte hervorgeht. Die Durchschnittswerte der Depressionen schwanken nämlich zwischen 0,526°, als dem kleinsten Wert bei menschlichem Blute, bis 0,638° beim Blut der Katze als dem höchsten Wert.

Weiter sind aber diese Werte berechnet aus verschiedenen Reihen von Ergebnissen, die auch große gegenseitige Differenzen aufweisen. So liegen z. B. die für Rinderblut gefundenen Werte zwischen 0,543° und 0,647°, also Differenzen bis etwa 20% des kleinsten Wertes anzeigend. Und auch beim Blut der anderen Tierarten wurden gleichartige Unterschiede gefunden.

Die Ansicht Winters, daß die Gefrierpunkterniedrigung beim Blut für alle Tierarten gleich sei (Homoiosmie), wird also durch diese Zahlen nicht bestätigt, selbst dadurch schien festgestellt zu werden, daß der Gefrierpunkt des Blutes einer Tierart bedeutenden Schwankungen unterliegt. Wie groß aber diese Schwankungen sind, geht daraus nicht mit Sicherheit hervor. Die gefundenen Differenzen werden nämlich teils auf Rechnung experimenteller Fehler gestellt, teils vielleicht auch den verschiedenen physiologischen Bedingungen der Versuchstiere zugeschrieben werden können.

Eine Nachprüfung dieser Frage an einer möglichst großen Zahl von Tieren derselben Gattung mit Berücksichtigung des physiologischen Zustandes der untersuchten Individuen schien mir also nicht überflüssig zu sein.

Auch die Frage, ob die Milch in vollkommenem osmotischem Gleichgewicht mit dem Blut abgeschieden wird, ist experimentell sehr wenig erforscht worden. Obgleich es mir scheint, daß sie im allgemeinen bejahend beantwortet wird, findet man in den physiologischen Handbüchern immer nur

---

[1]) Hamburger, Osmotischer Druck und Ionenlehre 1, 459.

dieselben fünf Bestimmungen des Gefrierpunktes von Blut und Milch desselben Tieres, und zwar vier von Kühen und eine von einer Ziege, die 1900 von Koeppe[1]) bekanntgegeben wurden. Die größte Differenz zwischen Δ von Blut und Milch desselben Tieres wurde von Koeppe zu 0,01° gefunden. Später fand auch Nagelschmidt[2]) für die Gefrierpunkte des Blutes und der Milch derselben Ziege ziemlich gleiche Werte, die bis 0,03° auseinandergehen. Inzwischen gibt dieser Forscher für Δ der Milch derselben Zeige resp. 0,58°, 0,55°, 0,58°, 0,52°, 0,52°, 0,60°, 0,59°, 0,54° und 0,60° an; diese große Schwankungen rechtfertigen es jedoch, gegründete Zweifel über die Genauigkeit dieser Untersuchungen zu hegen.

Über den Einfluß von verschiedenen physiologischen und pathologischen Einflüssen auf das Verhältnis zwischen Δ bei Blut und Milch wurden bisher keine Untersuchungen angestellt. Wohl sind mehrere Gefrierpunktbestimmungen des Sekrets kranker Milchdrüsen bekannt gemacht, die große Abweichungen von den normalen Werten aufweisen. In diesen Fällen ist jedoch der Gefrierpunkt des Blutes niemals bestimmt worden.

Außer den oben genannten Bestimmungen von Koeppe wird als Beweis für die Gleichheit der osmotischen Konzentrationen von Blut und Milch desselben Tieres angeführt, daß Δ dieser beiden Körperflüssigkeiten innerhalb derselben Grenzen schwankte. Wie weit jedoch diese Grenzen beim Blut auseinandergehen, wurde schon oben mitgeteilt.

Auch die von den verschiedenen Forschern ermittelten Gefrierpunkte von Milch derselben Tierart weisen bedeutende Schwankungen auf, die jedoch, wie beim Blut, auch teilweise den Fehlern des Eexperiments, vielleicht auch physiologischen Einflüssen zuzuschreiben sind. Die Frage, ob die Milch mit genau derselben osmotischen Konzentration aus dem Blute abgeschieden wird, war also der experimentellen Begründung noch sehr bedürftig. Besonders wäre noch zu prüfen, inwieweit verschiedene physiologische und pathologische Zustände imstande sind, auf das Verhältnis der Konzentrationen dieser Flüssigkeiten Einfluß auszuüben.

---

[1]) Physikalische Chemie in der Medizin 1900.

[2]) Zeitschr. f. klin. Med. **42**, 247, 1901.

Indem ich für eine ausführliche Behandlung der Gefrierpunktbestimmung auf Dekhuyzen[1]) verweisen kann, will ich hier in aller Kürze die bedeutendsten Fehlerquellen andeuten, die zu fehlerhaften Resultaten führen können. Es sind dies:

1. Zu tiefe Temperatur des Kühlbades, wodurch während der Bestimmung der Depression der zu untersuchenden Flüssigkeit zu viel Wärme entzogen wird, wodurch Δ zu groß gefunden wird.

2. Zu tiefe Unterkühlung der untersuchten Flüssigkeit, wodurch zu viel Eis ausfrieren muß und deshalb die Konzentration zu sehr zunimmt, wodurch der gefundene Gefrierpunkt tiefer liegt als der wirkliche Punkt.

3. Bestimmung der Δ bei einer zu kleinen Flüssigkeitsmenge. Auch dadurch muß eine relativ zu große Menge Eis ausfrieren, um die Wärmemenge zu liefern, die Glas, Thermometer und Rührer bis auf die Temperatur des Gefrierpunktes erwärmen muß.

4. Zu kräftiges Rühren, wodurch Wärme entwickelt wird; zu leises Rühren, wodurch Entmischung während des Gefrierens — bei wenig viscösen Flüssigkeiten zu befürchten — stattfinden kann.

5. Ungenügende Homogenität des Kühlbades, ungenügender Schutz der zu untersuchenden Flüssigkeit gegen Wärmezufuhr aus der Umgebung, sei es dadurch, daß ihre Oberfläche nicht tief genug unter der des Kühlbades liegt, sei es, daß beim Rühren der Rührer jedesmal aus der Flüssigkeit gehoben wird, wodurch Wärme zugeführt wird; oder durch andere Fehler bei der Ausführung der Bestimmung.

6. Durch Fehler in der Teilung des Gefrierpunkt-Thermometers.

Die Bestimmungen für die Praxis mit dem einfachen Beckmann-Apparat werden am besten unter den folgenden Bedingungen ausgeführt: Die Kühlmischung wird auf $-2{,}5^0$ bis $-3{,}5^0$ gehalten; die Unterkühlung betrage möglichst genau 1^0. Man nehme immer dieselbe Menge, etwa 40 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit.

Zu Beginn und am Ende einer jeden Reihe von Bestim-

[1]) Dekhuyzen, Diese Zeitschr. 1906, 346.

mungen wird der Gefrierpunkt reinen Wassers unter genau denselben Bedingungen und Kautelen bestimmt. Man benutze ein Thermometer in 0,01^0 geteilt mit festem Nullpunkt, bei dem 0,001^0 mit der Lupe leicht zu schätzen seien. Das Thermometer wird mittels Lösungen von bekanntem Gefrierpunkt kontrolliert; von Zeit zu Zeit muß diese Kontrolle wiederholt werden.

Ich habe immer so verfahren, daß die zu untersuchenden Flüssigkeiten in Eis vorgekühlt, dann mit Thermometer und Rührer versehen, bis 1^0 unter dem erwarteten Gefrierpunkt abgekühlt wurden, unter leisem Rühren. Dann wurden sie schnell in den Luftmantel hineingesetzt und mit einer Spur Eis geimpft; bei langsamem Rühren und Klopfen des Thermometers am Ende der Temperatursteigung wurde der höchst erreichte Punkt als der Gefrierpunkt abgelesen.

Unter diesen Bedingungen wurde die Gefrierpunkterniedrigung einer Lösung von 0,9 g NaCl in 100 g Wasser auf 0,542^0, der einer Lösung von 1 g in 100 g Wasser auf 0,600^0 bestimmt. Korrektionen sind an diesen und an allen folgenden Depressionen nicht angebracht.

Gefrierpunkte von Blut und Milch desselben Tieres.

Wo sonst unter normalen Verhältnissen ausschließlich „trockene" Kühe geschlachtet werden, wurden im vergangenen Jahre, den gegenwärtigen abnormalen Zeitumständen zufolge, eine große Zahl von Tieren zur Schlachtbank geführt, die noch mehr oder weniger Milch gaben.

Dadurch war ich imstande, bei einer großen Reihe von Kühen sowohl die Milch als das Blut kryoskopisch zu untersuchen. Zu gleicher Zeit konnte Δ der Galle bestimmt werden.

Das Blut wurde defibriniert dadurch, daß es in Flaschen mit Glaskugeln geschüttelt wurde. Hedin und zu gleicher Zeit Hamburger haben gezeigt, daß Δ bei Blut und defibriniertem Blut dieselbe ist. Ich habe in mehreren Fällen das Blut sowohl mit als auch ohne Luft geschüttelt und dabei zwischen den Δ's keinen Unterschied gefunden.

Die Milch wurde aus allen noch sezernierenden Vierteln des Euters entnommen und gemischt. Zwischen dem Melken und der Schlachtung verlief nur kurze Zeit, gewöhnlich nur einige Minuten. Die Galle wurde der Gallenblase entnommen.

Von diesen Milch-, Blut- und Gallenproben wurde unter den oben genannten Bedingungen und Kautelen der Gefrierpunkt unmittelbar nacheinander bestimmt. Die gefundenen Werte sind also untereinander vollkommen vergleichbar und weichen von den wahren Gefrierpunkten höchstens um 0,01° ab.

Nr. der Kuh	Δ defibr. Blut °	Δ Milch °	Δ Galle °	$\Delta_{Blut} - \Delta_{Milch}$ °	$\Delta_{Blut} - \Delta_{Galle}$ °
1	0,545	0,542	0,540	+ 0,003	+ 0,005
2	0,538	0,532	0,531	+ 0,006	+ 0,007
3	0,547	0,551	0,551	— 0,004	— 0,004
4	0,557	0,554	0,554	+ 0,003	+ 0,003
5	0,551	0,555	0,540	— 0,004	+ 0,011
6	0,541	0,541	0,540	0,000	+ 0,001
7	0,540	0,540	0,539	0,000	+ 0,001
8	0,539	0,541	0,541	— 0,002	— 0,002
9	0,530	0,537	0,546	— 0,007	— 0,016
10	0,568	0,555	0,573	+ 0,013	— 0,005
11	0,544	0,540	0,550	+ 0,004	— 0,006
12	0,562	0,561	0,559	+ 0,001	+ 0,003
13	0,545	0,556	0,545	— 0,011	0,000
14	0,557	0,559	—	— 0,002	—
15	0,546	0,545	0,542	+ 0,001	+ 0,004
16	0,551	0,550	0,563	+ 0,001	— 0,012
17	0,550	0,558	0,572	— 0,008	+ 0,022
18	0,546	0,546	—	0,000	—
19	0,549	0,541	0,535	+ 0,008	+ 0,014
20	0,545	0,544	0,547	+ 0,001	— 0,002
21	0,530	0,537	0,536	— 0,007	— 0,006
22	0,548	0,542	0,560	+ 0,006	— 0,012
23	0,535	0,535	0,534	0,000	+ 0,001
24	0,542	0,544	—	— 0,002	—
25	0,560	0,558	—	+ 0,002	—
26	0,537	0,541	—	— 0,004	—
Im Durchschnitt	0,546	0,546	0,547	0,000	+ 0,001

Aus diesen Bestimmungen geht mit größter Klarheit hervor, daß beim Rind Δ von Blut, Milch und Galle genau denselben Wert besitzt. Die Differenzen sind in den meisten Fällen sehr gering und liegen mit nur ein paar Ausnahmen ganz innerhalb der Grenzen der Bestimmungsfehler, die auf etwa 0,005° geschätzt werden dürfen. Auch liegen die Differenzen nach beiden Seiten so, daß die durchschnittliche Differenz Null ist.

Als bewiesen darf also angenommen werden, daß sowohl die Milch wie die Galle in vollkommenem osmotischem Gleichgewicht stehen zu dem Blute, woraus diese Flüssigkeiten abgeschieden werden.

Die kleinen Differenzen, die gefunden wurden, sind darauf zurückzuführen, daß nicht genau dasselbe Blut, woraus die Galle und die Milch abgeschieden sind, untersucht worden ist. Dazu hätten wir das Blut während der Sekretion aus der Leber, resp. aus dem Euter, entnehmen sollen, was schwer ausführbar wäre. Kleine Schwankungen in der Konzentration des Blutes während des Zeitintervalles zwischen dem Beginn der Sekretion und dem Augenblick der Schlachtung können die Unterschiede leicht erklären. Daß in der Tat die präformierte Milch eine andere Depression besitzen kann wie die letzte Milch aus dem Euter, die während des Melkens sezerniert wird, haben wir in einem der folgenden Experimente deutlich wahrnehmen können.

Auch auf ein anderes Ergebnis darf noch die Aufmerksamkeit gelenkt werden, daß nämlich Δ dieser Milchproben einzelner Kühe genau innerhalb derselben Grenzen fällt, die bei der Mischmilch gefunden werden.

Auch bei Ziegen haben wir in einigen Fällen Milch und Blut desselben Tieres kryoskopisch untersuchen können, wobei wir obengenanntes Gesetz der Gleichheit der osmotischen Konzentrationen bestätigen konnten.

Nr. der Ziege	Δ defibr. Blut °	Δ Milch °	$\Delta_{Blut} - \Delta_{Milch}$ °
1	0,591	0,577	+ 0,014
2	0,589	0,577	+ 0,012
3	0,573	0,579	− 0,006
4	0,590	0,607	− 0,017
5	0,578	0,578	± 0,000
Im Durchschnitt	0,584	0,584	0,000

Wiewohl uns die Folgerung richtig scheint, daß Δ beim Blute zwischen denselben Grenzen schwanken wird wie bei der Milch, also $0{,}53^0$ und $0{,}56^0$ nicht bedeutend überschreiten kann und im Durchschnitt etwa $0{,}545^0$ betragen muß, haben wir noch bei einer größeren Zahl von Kühen diese Eigenschaft des Blutes bestimmt, um mit Sicherheit festzustellen, wie weit die Grenzen für Δ auseinanderliegen können. Dies schien deshalb um so mehr erforderlich, als in der physiologischen Literatur Werte von Δ zu finden sind, die — wie schon oben

bemerkt wurde — sehr viel weiter auseinandergehen. Mögen dafür die experimentellen Fehler größtenteils verantwortlich gemacht werden können, so weisen auch die Untersuchungen, die in dieser Hinsicht zu den besten gerechnet werden müssen, noch große Differenzen auf. Hamburger hat diese Tabellen von Gefrierpunktbestimmungen zusammengestellt, die ich hierunter folgen lasse:

Untersucher	Zahl der Bestimmungen	Δ (Grenzen) °	Mittel °
Dreser	4	0,58 — 0,61	0,592
Hamburger	1	0,647	0,647
Hedin	1	0,582	0,582
Lazarus und Barlow .	3	0,549 — 0,629	0,589
Winter	2	0,55	0,55
Bugarsky und Tangl .	5	0,56 — 0,633	0,611
Ubbel	8	0,543 — 0,565	0,556
		Allgemeiner Mittelwert	0,585

Bei diesen Bestimmungen liegt also Δ zwischen 0,543° und 0,647° und die größte Differenz macht also nicht weniger als etwa 20°/₀ von dem kleinsten Werte aus. Die oben von uns mitgeteilten Depressionen zeigen nicht nur viel kleinere Unterschiede, sie sind im Mittel auch 0,04° kleiner.

Von 21 Kühen, die ganz trocken standen und dem Anschein nach gesund waren (bei der Schlachtung), wurde Δ des defibrinierten Blutes bestimmt, bei einigen auch noch Δ der Galle, wobei wir die folgenden Werte fanden:

Nr.	Δ_{Blut} °	Δ-Galle °	$\Delta_{Blut} - \Delta_{Galle}$ °	Nr.	Δ_{Blut} °
1	0,544	—	—	11	0,556
2	0,583	0,572	+ 0,009	12	0,556
3	0,545	0,544	+ 0,001	13	0,568
4	0,548	0,556	— 0,008	14	0,560
5	0,543	0,544	— 0,001	15	0,564
6	0,555	0,562	— 0,007	16	0,540
7	0,556	0,546	+ 0,010	17	0,535
8	0,551	0,554	— 0,003	18	0,552
9	0,545	0,531	+ 0,014	19	0,566
10	0,535	0,540	— 0,005	20	0,543
				21	0,554

Durchschnitt von 21 Δ's von Rinderblut 0,552°
" " 10 Δ's von Rindergalle 0,545°
" " $\Delta_{Blut} - \Delta_{Galle}$ (10 Tiere) + 0,001°.

Von den in toto untersuchten 47 Kühen lag bei 39 Individuen (83 %) Δ zwischen 0,535° und 0,56°; mit nur einer Ausnahme[1]) liegen alle Werte von Δ zwischen 0,53° und 0,568°. Diese Depressionen liegen also um 7 % der kleinsten Δ auseinander und haben als allgemeinen Mittelwert 0,549°.

Einfluß der Nahrung.

Alle diese Bestimmungen wurden ausgeführt bei Blut von Rindern, von denen es sich nach dem Schlachten herausstellte, daß sie gesund waren. Überdies befanden sie sich in genau physiologisch vergleichbarem Zustande, was die Aufnahme von Nahrung betrifft, weil sie alle 24 bis 48 Stunden gehungert hatten, als ihnen Blut entnommen wurde. Daher wäre es nicht ausgeschlossen, daß größere Schwankungen vorkommen können bei Δ des Blutes von Tieren, die in dieser Hinsicht in weniger gleichartigen Umständen sich befunden haben. Auf Grund dieser Erwägung haben wir geprüft, ob der osmotische Druck des Blutes beim Rinde durch die Aufnahme von Nahrung geändert wird und in welcher Richtung diese Änderung stattfindet.

Dies war um so eher nötig, weil über diese Frage beim Menschenblut Meinungsverschiedenheiten bestehen. Koeppe hat l. c. mitgeteilt, daß der osmotische Druck des menschlichen Blutes in einem Tage von 0,225 bis 0,27 Grammoleküle pro Liter schwanken kann, was nach seiner Berechnung mit Gefrierpunktänderungen von —0,508° bis —0,635° parallel geht. Nach Koeppe würde also in einem Tage die Konzentration des Blutes um mehr als 25 % zunehmen können! Er schrieb diese Schwankungen der Nahrungsaufnahme zu, weil nach dem Mittagessen die größte Konzentration ermittelt wurde und auch Salzaufnahme (10 g in 200 g Wasser) eine deutliche Zunahme der Gefrierpunktdepression verursachte. Die Konzentration des Blutes wurde mittels seiner Hämatokritmethode bestimmt. Wie Hamburger schon angibt, sind diese Werte nicht richtig. Schoute[2]) hat in Hamburgers Laboratorium diese Frage am menschlichen Blute näher studiert und fand, daß Aufnahme von Nahrung die osmotische Konzentration des

---

[1]) $\Delta = 0{,}583°$. Es ist zu bedauern, daß in diesem Falle die Nieren nicht histologisch untersucht werden konnten.

[2]) Med. Diss. Groningen 1904.

Blutes etwas erhöhte; Δ war bei Personen, die vor dem Aderlaß gegessen hatten, 0,02° bis 0,03° im Durchschnitt größer als bei Individuen, denen vorher eine Milch-Eierdiät verabreicht worden war und denen das Blut morgens in nüchternem Zustande entnommen wurde.

Diesen Resultaten gegenüber steht die Erfahrung Violas[1]), daß die Nahrungsaufnahme keinen sichtbaren Einfluß auf den Gefrierpunkt des Blutes ausübt. Auch Kümmel-Koranyi usw., die viele Gefrierpunktbestimmungen beim menschlichen Blute machten, erwähnen keinerlei Einfluß der Nahrungsumstände.

Auf Grund vieler Untersuchungen von Dastre und Loie[2]), Hamburger[3]), Groslik[4]), Loeper[5]), Buglia[6]) u. a., woraus die große osmoregulatorische Tätigkeit des Gefäßsystems hervorgeht, würde man a priori einem so normalen physiologischen Prozeß, wie die Nahrungsaufnahme, keinen bedeutenden Einfluß auf die osmotische Konzentration des Blutes zuzuschreiben geneigt sein.

Wir haben versucht, einen solchen Einfluß bei einigen Kühen folgenderweise zu ermitteln:

1. Versuch.

Eine Kuh, die 24 bis 48 Stunden keinerlei Nahrung genossen hatte, wurde um 11 Uhr vormittags gemolken; aus allen 4 Vierteln wurde $\pm$ 2 dl Milch entleert. Um 1 Uhr wird ihr 2 kg Leinkuchen und Überfluß von Heu gegeben, von dem sie viel frißt. Um 4 Uhr wird ihr darauf durch Aderlaß aus der V. jugularis Blut entnommen, nachdem sie zuvor gemolken ist ($\pm$ 4 dl). Von $4^1/_2$ Uhr nachmittags an wird ihr weder Nahrung noch Wasser gegeben. Um $10^1/_2$ Uhr abends wird sie gemolken; ebenfalls am folgenden Morgen um $8^1/_4$ Uhr. Dann wurde ihr wieder Blut durch Aderlaß abgezapft. Die Gefrierpunktbestimmungen gaben die umstehenden Werte:

1) Zitiert nach Hamburger, Osm. Druck und Ionenlehre **1**, 503.
2) Arch. de phys. norm. et de path. **1889**, 253 u. 265.
3) Zeitschr. f. Biol. **27**, 249, 1890.
4) Arch. de phys. norm. et de path. **1890**, 704.
5) J. de phys. et de path. **5**, 79 (1903).
6) Diese Zeitschr. **13**, 400, 1908.

Zeit	Nahrungsverhältnisse	Blut-Δ 1. Best. °	Blut-Δ 2. Best. °	Δ-Blut Mittelwert °	Milch-Δ 1. Best. °	Milch-Δ 2. Best. °	Milch-Δ Mittelwert °
11. 3. 15, 10h vm.	Fastet 24—48 Stunden	—	—	—	0,555	0,552	0,554
11. 3. 15, 4h nm.	Hat seit 3 Std. Nahrung aufnehmen können.	0,557	—	0,557	0,559	0,559	0,559
11. 3. 15, 10 1/2h nm.	Hat seit 4 Uhr nichts zu sich genommen	—	—	—	0,559	0,563	0,561
12. 3. 15, 8 1/2h vm.	Hat seit 16 Std. nichts zu sich genommen	0,546	0,546	0,546	0,544	0,545	0,545

2. Versuch.

Drei Kühe, A, B und C, die länger als 24 Stunden gehungert haben, werden am 16. März um 5 Uhr nachmittags gemolken. C ist an einem Hinterviertel ganz trocken; ein Vorderviertel ist krank (Mastitis chronica). Das Sekretionsprodukt ist makroskopisch in hohem Maße abweichend.

A gibt noch viel, B nur wenig Milch.

Alle drei Tiere bekommen jetzt in den ersten 24 Stunden weder Nahrung noch Wasser. Dann werden sie am 17. März 1915, 5 Uhr nachmittags gemolken, wobei die Milch aus dem kranken Viertel von C gesondert aufgefangen wird. Durch Aderlaß wird aus der V. jugularis nach dem Melken Blut entnommen und defibriniert. Darauf wird allen drei Kühen 2 kg Leinkuchen und soviel Heu gegeben wie sie haben wollen. Sie fressen sehr gut. Am folgenden Morgen 8 Uhr werden sie gemolken, wobei A ± 6 l, B ± 2 l Milch gibt. Die Milch von B jetzt ist abnormal und enthält etwa 10 % feinkörniges Sediment.

Von C wird die Milch aus dem kranken Viertel getrennt aufgefangen.

Zeit	Nahrungsverhältnisse	Kuh A Δ Blut °	Kuh A Δ Milch °	Kuh B Δ Blut °	Kuh B Δ Milch °	Kuh C Δ Blut °	Kuh C Δ Milch (gesunde Viertel) °	Kuh C Δ Milch (krankes Viertel) °
16. 3. 15, 5h nm.	Fastet seit 24 Stunden . . .	—	0,562	—	0,547	—	0,565	
17. 3. 15, 5h nm.	Fastet seit 2 × 24 Stunden . . .	0,553	0,560	0,538	0,541	0,539	0,537	0,549
18. 3. 15, 8h vm.	Hat seit 14 Stunden Nahrung aufnehmen können	0,544	0,544	0,532	0,537	0,548	0,542	0,551
		0,547	→	0,528	→	0,549	→	Carotisblut
		0,547	→	0,536	→	0,560	→	Galle

Sofort nach dem Melken wird durch Aderlaß Blut entnommen, und darauf werden die Tiere geschlachtet, wobei ausschließlich Blut aus der A. carotis aufgefangen wird.

Die Gefrierpunktbestimmung des Blutes und der Milch werden wieder sofort nacheinander in derselben Reihenfolge bestimmt und liefern die auf S. 300 stehenden Werte.

Eigenschaften der Milch;

	A	B	C gesunde Viertel	C krankes Viertel
Milchzucker	4,56 %	0,87 %	2,1 %	0,37 %
Asche	0,66 %	0,99 %	0,95 %	1,02 %
Chlor	0,105 %	—	0,265 %	0,284 %

3. Versuch.

Eine Kuh, die wenigstens 24 Stunden hungerte, wurde um 11 Uhr vormittags gemolken; um 12 Uhr wurde ihr durch Aderlaß Blut aus der V. jugularis entnommen. Dann wurde ihr 1,5 kg Leinkuchen und 5 kg Heu gegeben, aber kein Wasser. Um 3 Uhr nachmittags wurde sie wieder gemolken und zur Ader gelassen. Sie bekam dann keine Nahrung mehr bis 11,5 Uhr am folgenden Tage, wenn sie gemolken und darauf geschlachtet wurde, wobei das Blut aufgefangen wurde.

Es wurden die folgenden Gefrierpunktdepressionen gefunden:

Zeit	Nahrungsverhältnisse	Blut °	Milch °	Galle °
24. 3. 15, 11^h vm.	Die Kuh hungert wenigstens 24 Stunden	0,542	0,544	—
id. 3^h nm.	Die Kuh hat seit 3 Stunden Nahrung . . .	0,552	0,551	—
25. 3. 15, 9^h vm.	Die Kuh hat wieder 18 Stunden gehungert	0,570	0,568	0,569

Analyse der Milch am 25. März:

Milchzucker . . . 3,78 %
Chlor . . . . . 0,153 g in 100 ccm
Asche . . . . . 0,78 %.

4. Versuch.

Einfluß des Hungerns auf Δ der Milch.

Eine Kuh, die wenigstens 24 Stunden hungerte, wird gemolken und bekommt dann während 24 Stunden keine Nahrung. Darauf wird sie wieder gemolken und geschlachtet.

16. 3. 15, 5^h nm. Hungert wenigstens 24 Stunden Δ Milch 0,545°
17. 3. 15, 5^h nm. Die Kuh hungert wenigstens
2 × 24 Stunden . . . . Δ Milch 0,541°
Δ Blut 0,538°

Eine Ziege, deren Milch einen Gefrierpunkt von —0584° zeigte, hungerte 55 Stunden, worauf sie gemolken und geschlachtet wurde. Δ Milch = 0,578°, Δ Blut = 0,578°.

Aus diesen Experimenten geht also hervor, daß die Aufnahme von Nahrung weder die Gefrierpunktdepression des Blutes noch die der Milch beeinflußt.

Gegenüber einer kleinen Zunahme von Δ der Milch der Kuh des ersten Versuchs, wo Δ nach 24stündigem Hungern 0,554° beträgt, während Δ, nachdem die Kuh während drei Stunden Nahrung hatte, auf 0,559° und 6 Stunden später auf 0,561 steigt, und eine etwas größere Zunahme im 3. Versuch, wo Δ des Blutes von 0,542 bis 0,552° anwächst und selbst nachdem die Kuh wieder während 18 Stunden hungert, auf 0,570° steigt, stehen doch die Resultate bei den Kühen A und B der 2. Versuchsreihe, wo Δ des Blutes größer gefunden wurde, nachdem die Tiere während 48 Stunden gehungert hatten, als nachdem sie während 14 Stunden Nahrung in Überfluß gehabt hatten.

Beim Rinde findet also die Abscheidung von gelösten Teilchen aus dem Blut mit derselben Geschwindigkeit statt wie die Aufnahme aus dem Darme.

Auch das Hungern während ein paar Tagen beeinflußt Δ des Blutes nicht in bedeutendem Maße, was auch P. Tria[1]) bei Hunden und Kaninchen, und G. d'Errico[2]) mitgeteilt haben. Der Gefrierpunkt der Milch ist also auch davon unabhängig.

Ich habe versucht, ob es möglich sei, durch Einbringen von vielem Wasser in den Verdauungstraktus das Blut zu verdünnen, resp. dessen Konzentration durch Einbringen von starken Salzsolutionen zu vergrößern. Es wäre dann weiter von Interesse, zu untersuchen, ob der Gefrierpunkt der Milch den eventl. Schwankungen des Blutes folgen würde. Es wurden die folgenden Untersuchungen angestellt.

[1]) Arch. di Farmacol. sperim. 8, 1909.
[2]) Arch. di Fisiol. 8.

1. Versuch.

Eine Kuh, die wenigstens 24 Stunden hungerte, wurde am 24. 3. 15 um $10^1/_2$ Uhr gemolken und zur Ader gelassen. Um 12 Uhr wurde ihr per os 16 l, per rectum 20 l Wasser eingegossen. Hiervon flossen 3 l ab. 1 Stunde später wurde ihr wieder Blut entnommen und sie wurde gemolken, wobei erst das Euter fast ganz geleert wurde, und die letzte Milch, etwa 50 ccm aus allen Vierteln zusammen, getrennt aufgefangen wurden. Um $3^1/_2$ Uhr wurde ihr wieder Blut und Milch entnommen. Darauf blieb sie ohne jede Nahrung bis $11^1/_2$ Uhr am folgenden Tage, wo sie gemolken und geschlachtet wurde. Die Kuh fühlte sich sichtbar unbehaglich, nachdem ihr das Wasser eingegossen war. Sie schauderte, die Haut war kalt, ihre Temperatur war jedoch normal (38°).

Die Gefrierpunktbestimmungen lieferten die folgenden Werte:

Zeit	Verhältnisse	Δ-Blut °	Δ-Milch Erster Teil °	Δ-Milch Letzter Teil °
24. 3. 15, $10^1/_2{}^h$	Hat mindestens 24 Stunden gehungert	0,530	0,537	
id. $12^3/_4{}^h$	Vor $^1/_2$ Stunde wurden ihr 33 l Wasser eingegossen . . .	0,523	0,536	0,540
id. $3^1/_4{}^h$	—	0,519	0,521	0,523
25. 3. 25, $11^1/_2{}^h$	Hat seit der Wasseraufnahme nichts gegessen od. getrunken	0,538	0,534	
	Galle	0,535		

Eigenschaften der Milch:

Lactose: 3,48 %,
Asche: 0,78 %,
Chlor: 0,156 g pro 100 ccm.

2. Versuch.

Einer anderen Kuh wurden per rectum 15 l, per os 10 l Wasser eingegossen, wobei die auf S. 304 oben folgenden Resultate gefunden wurden.

Die gezwungene Aufnahme von vielem Wasser hat also die Konzentration des Blutes in beiden Fällen deutlich herabgesetzt, sei es auch nur wenig.

Im ersten Versuch war schon nach $^1/_2$ Stunde der Gefrierpunkt des Blutes etwas höher, die Milch hatte jedoch noch ihre normale Depression. Etwa 3 Stunden nach der Wasser-

Zeit	Verhältnisse	Δ-Blut °	Δ-Milch Erster Teil °	Δ-Milch Letzter Teil °
11ʰ vormittags.	Die Kuh hungert während 24 Stunden	0,549	0,559	—
	Es werden 25 l Wasser eingegossen.	0,549	0,559	
$12^1/_2$ʰ nachm. .	—	0,528	0,551	0,538
$3^1/_2$ʰ „ .	—	0,523	0,523	0,523
	Galle	0,523		

aufnahme war Δ beim Blut noch etwas kleiner geworden; auch Δ der Milch hatte dann abgenommen.

Noch deutlicher ist der Einfluß der Wasseraufnahme auf die Blutkonzentration in der zweiten Probe. Nach 1 Stunde ist Δ um 0,02° kleiner, nach 3 Stunden 0,026°. Das Gleichgewicht zwischen der osmotischen Konzentration von Blut und Milch bleibt aber unberührt. Bemerkenswert ist jedoch hier der Unterschied zwischen Δ der ersten Milch (präformiert) und Δ der letzten Milchstrahlen eine Stunde nach der Wasseraufnahme.

3. Versuch.

Einer Kuh, die mindestens 48 Stunden hungerte, wurde, nachdem Melken und Aderlaß stattgefunden hatten, 1 kg Glaubersalz, in 2 l Wasser gelöst, eingegeben. Dann wurden ihr $3^1/_2$ und $5^1/_2$ Stunden später Blut und Milch entnommen, wobei wieder die letzte Milch getrennt aufgefangen und untersucht wurde. Nach 12 Stunden bekam sie eine heftige Diarrhöe; 22 Stunden später wurden ihr aufs neue Blut und Milch entnommen; sie bekommt dann Heu und Wasser, wovon sie 45 l trinkt. Weitere $5^1/_2$ Stunden später wurde sie gemolken und geschlachtet.

Es wurden die S. 305 oben folgenden Gefrierpunktdepressionen gefunden.

Durch die Glaubersalzgabe wurde also eine sehr deutliche Zunahme der Blutkonzentration verursacht, womit jedoch eine ganz gleiche Vergrößerung der Gefrierpunktdepression bei der Milch parallel ging. Nach Wasseraufnahme erholt sich die Kuh innerhalb einiger Stunden.

Wiewohl es also möglich ist, die molekuläre Konzentration

Zeit	Verhältnisse	Δ-Blut °	Δ-Milch Erster Teil °	Δ-Milch Letzter Teil °
19. 4., 11^{h} vm.	Die Kuh hungert mindestens 48 Stunden	0,542	—	—
id. 11$^{1}/_{2}{}^{h}$ vm.	Sie hat 1 kg Glaubersalz aufgenommen			
id. 3^{h} nm.	—	0,577	0,577	0,578
id. 5^{h} nm.	—	0,587	0,582	0,582
20. 4., 9$^{1}/_{2}{}^{h}$ vm.	—	0,581	0,585	0,585
	Sie trinkt jetzt 45 l Wasser und bekommt Heu			
id. 3^{h} nm.	—	0,541	0,540	0,540

des Blutes durch starke Gaben von Wasser oder Salz vom Darmkanale aus zu verändern, so wird dadurch das Gleichgewicht zwischen Blut und Milch nicht gestört und diese Flüssigkeiten behalten denselben Gefrierpunkt.

Schlußfolgerung.

1. Die Milch und die Galle hatten die gleiche osmotische Konzentration wie das Blut, woraus sie sezerniert werden.

2. Die Gefrierpunktdepression von normalem Rinderblut liegt zwischen 0,53° und 0,57°.

3. Der Gefrierpunkt ist von den zeitweiligen Nahrungsverhältnissen des Rindes unabhängig. Auch das Hungern während einiger Tage übt auf den Gefrierpunkt des Blutes, also auch auf den der Milch, keinen Einfluß aus.

4. Es ist möglich, durch erzwungene Verdünnung des Darmkanalinhalts beim Rind Δ des Blutes zu verkleinern, resp. durch starke Glaubersalzgaben zu vergrößern. Die Gleichheit zwischen den Gefrierpunkten bei Milch und Blut bleibt selbst unter diesen abnormen Verhältnissen bestehen.

5. Die Gefrierpunktbestimmung ist das sicherste und genaueste Mittel zur Ermittlung geringen Wasserzusatzes zu der Milch. Jede Milch, wovon der Gefrierpunkt höher liegt wie — 0,53°, muß als gewässert bezeichnet werden.

Den Einfluß pathologischer Zustände auf den Gefrierpunkt des Blutes und der Milch hoffe ich in einer bald folgenden Mitteilung zu erörtern.

Über eine labile Eiweißform und ihre Beziehung zum lebenden Protoplasma.

Von

Oskar Loew.

(Eingegangen am 2. Juli 1915.)

Das Protoplasma besteht bekanntlich aus einem festen und einem zähflüssigen Anteile. Beide Anteile sind innig miteinander vereinigt. So schließen die äußere und innere Wand des Cytoplasmas, die sich durch die Plasmolyse als feste Strukturen dartun lassen, eine Schicht von zähflüssiger Beschaffenheit ein. Die Strukturen des Zellkernes, der Chromosomen und Zentrosomen, sowie der pflanzlichen Chromoplasten und Leukoplasten entsprechen dem festen Aggregatzustand, trotzdem sie viel Wasser gebunden enthalten. Dem zähflüssigen Protoplasma dürfte hauptsächlich die Funktion des Stoffwechsels und der Energiegewinnung durch Respiration zukommen, während die festen Strukturen, die natürlich ebenfalls Respiration ausüben, als Erzeuger gewisser Baustoffe und Faktoren der Ernährung, der Vermehrung und des Wachstums gelten können.

Darüber dürfte heutzutage wohl kein Zweifel mehr existieren, daß die Eiweißkörper des lebenden Protoplasmas äußerst labile Stoffe sind, die unter schädlichen Einflüssen leicht Umlagerung zu stabilen Produkten erleiden[1]). Aber auch die Tektonik der festen Plasmagebilde muß als eine labile betrachtet werden, da schon geringe mechanische Störungen, wie Druck und Stoß, eine tödliche Strukturstörung herbeiführen können. Das Protoplasma ist als e i n l a b i l e r B a u a u s l a b i l e m M a t e r i a l anzusehen.

---

[1]) Öfters ist dieses Absterben mit der Explosion einer leicht zersetzbaren Substanz verglichen worden, aber dieser Vergleich ist völlig unzutreffend, denn eine chemische Umlagerung in einem Molekül ist doch nicht identisch mit einer totalen Zerstörung desselben.

Wir müssen, wie so oft in der Chemie, so auch beim Eiweiß zwischen einer labilen und einer stabilen Modifikation unterscheiden. Die stabile kommt gelöst in Säften der Organismen, ferner in Form von festen Körnchen (Aleuron) und manchmal in Krystallform aufgespeichert vor, besonders in den Samen der Pflanzen. Ebenso ist auch das Reserve-Eiweiß des Eierklars ein passiver, relativ stabiler Stoff, solange es nicht von den sich rasch mehrenden Zellen des Embryos aufgenommen und dem Protoplasma eingefügt worden ist. Erst dann beginnen seine Funktionen als lebende Materie. Die Bezeichnung „lebendes Eiweiß" ist keine einwandfreie; denn zum Leben gehört auch der Aufbau zu einem Apparat. Einzelne lebende Moleküle gibt es nicht, sondern labile oder aktive, die erst durch Organisation zu lebender Materie werden.

Der Übergang von einer labilen zu einer stabilen Modifikation ist bekanntlich viel leichter als der umgekehrte Vorgang. Je kinetisch-labiler ein Körper ist[1]), desto schwieriger ist er aus seiner stabilen Umlagerungsform zu regenerieren, ja in vielen Fällen ist dieses unmöglich[2]) und so wird es sich auch beim Eiweiß verhalten. Was die stabile, gewöhnliche Eiweißform betrifft, so dürfte diese überhaupt nie direkt synthetisch erzeugt werden, sondern stets aus der zuerst gebildeten labilen Eiweißform durch Umlagerung hervorgehen.

Wenn unsere Auffassung richtig ist, so ergibt sich die Frage: „Kann man eine labile Eiweißform in Pflanzenzellen nachweisen, die noch nicht durch den Organisationsprozeß zu lebendigem Protoplasma geworden ist?" Das ist in der Tat der Fall.

Ein solcher Stoff ist nicht nur in sehr vielen Pflanzenzellen vorhanden, sondern kommt auch sowohl im Zellsaft, als auch — wenigstens in einigen Fällen — im Cytoplasma gespeichert vor. Letzteres z. B. bei manchen Arten der Alge Spirogyra, besonders bei Spirogyra crassa, sowie bei Crassulaceen.

Über die Abscheidung der labilen Eiweißform aus ihrer

[1]) Ich habe bereits früher betont, daß man unterscheiden muß zwischen kinetisch-labilen und potenziell-labilen Verbindungen. Siehe O. L., Die chem. Energie der lebenden Zellen. II. Aufl. Kap. 9.

[2]) Man denke an die Umlagerungsprodukte des Aminoäthylaldehyds und des Diaminoacetons.

Lösung haben mein Kollege Bokorny und ich schon vor vielen Jahren die ersten Beobachtungen mitgeteilt[1]). Die damals noch unvollständigen Beobachtungen wurden seither mit mehrmaligen Unterbrechungen fortgesetzt und haben manches neue Material zur Beurteilung geliefert. Da aber noch immer in verschiedenen Zeitschriften und Lehrbüchern, besonders botanischer Art, ganz falsche Ansichten[2]) über den von uns beschriebenen Körper geäußert werden, so mag es mir erlaubt sein, an dieser Stelle das chemische Verhalten jener labilen Eiweißform übersichtlich darzustellen und meine neuesten Beobachtungen darüber mitzuteilen. Es handelt sich hier um Beobachtungen, die unter dem Mikroskop bei ca. 500facher Vergrößerung studiert werden müssen; aber diese Vorgänge sind so klar und unzweideutig, daß auch derjenige Chemiker, der nur makrochemisch zu arbeiten liebt, sich sofort leicht von der Richtigkeit unserer Tatsachen überzeugen kann.

Bevor wir jedoch auf eine ausführliche Schilderung der labilen Eiweißform eingehen, mag noch kurz das Verhalten der gleichen Objekte gegen Ammoniak, organische Basen, Alkohol und starke Salzlösung erwähnt werden. Eines der geeignetsten Objekte zu diesem Studium ist die Alge Spirogyra, von der zahlreiche Arten als Bewohner unserer stehenden Gewässer bekannt sind. Diese Alge hat völlig neutral reagierenden Zellsaft[3]) und liefert mit verdünntem Ammoniak, kohlensaurem Ammoniak und organischen Basen, feine granulierte Ausscheidungen, aber weder mit Lösungen von Kali oder Natron, noch mit Kalkwasser. Ferner ist bemerkenswert, daß konzentriertes Ammoniak keine derartige Ausscheidung hervorruft. Es ist daher völlig ausgeschlossen, daß die erwähnten Ausscheidungen lediglich die Folge einer Neutralisation wären. Werden Zellen, die durch Kochen, Alkohol oder Säuren getötet waren, mit verdünntem Ammoniak behandelt, so bleibt jede Spur von Ausscheidung aus.

---

[1]) Botanisches Zentralblatt 1889 Nr. 45/46.

[2]) Die Ausscheidungen durch verdünntes Ammoniak wurden für gerbsaures Eiweiß oder freien Gerbstoff erklärt, die mit Coffein für gerbsaures Coffein. Über die Zurückweisung dieser sonderbaren Ansichten siehe O. L., Die chemische Energie der lebenden Zellen. II. Aufl. S. 74; 95 und 96; ferner Flora, 102, 113 und 107, 111.

[3]) Siehe Loew und Bokorny, Botanische Zeitung 1887, 854.

Werden jene geeigneten Objekte mit absolutem Alkohol behandelt, so entsteht eine feinflockige Ausscheidung im Zellsaft, die sich sofort wieder löst, wenn der Alkohol nach einer Minute wieder durch Wasser ersetzt wird. Sie löst sich aber nicht mehr, wenn der Alkohol längere Zeit mit den Zellen in Berührung war.

Eine Lösung von 10 % Natriumnitrat bringt bei eiweißreichen Spirogyraarten in einem Teil der Zellen Plasmolyse hervor; ein anderer Teil aber stirbt sofort bei dieser Behandlung ab, und in diese gelangt nun sofort auch die konzentrierte Salzlösung, die nun ebenfalls eine Ausscheidung im Zellsaft in Form einer starken Trübung herbeiführt.

Mit Ammoniaklösung von 0,1 % behandelt, zeigen die Zellen schon nach einer Minute eine Trübung und nach 20 Minuten eine dicht gedrängte Körnchenausscheidung. Eine Ammoniaklösung von 0,01 % wirkt ebenso in 25 bis 30 Minuten. Nach 24 Stunden zeigen die in dieser Lösung befindlichen Algenzellen wohl, daß der Zellkern getötet ist und deformiert an der Seite der Zellen liegt, statt daß er in der Mitte aufgehängt ist; aber das Cytoplasma hat in vielen Zellen noch immer Turgor[1]).

In einer Ammoniaklösung von 0,001 % werden nach 30 Minuten ebenfalls zahlreiche Granula ausgeschieden, die aber nach 24 Stunden wieder verschwunden sind. In diesen Zellen bringt nun Ammoniak von 0,1 % eine erneute Ausscheidung hervor. Das Cytoplasma hat in den meisten Zellen noch vollen Turgor, jedoch ist der Zellkern in vielen Zellen beschädigt, sogar bei jener so hohen Verdünnung[2]).

Viele andere Basen wirken bei starker Verdünnung nicht mehr so energisch wie Ammoniak. Tetraäthyl-Ammoniumhydroxyd und Diacetonamin wirken noch kräftig bei 0,2 %. Py-

[1]) Vergleicht man die Giftigkeit einer 0,01 %igen Ammoniaklösung mit einer äquimolekularen Lösung von Ätzkali, so findet man bei Spirogyra, daß nach 2 Tagen in der Ammoniaklösung alle Zellen total abgestorben, in der Kalilösung aber kaum geschädigt sind. Bei Hefe hatte ich schon früher konstatiert, daß kohlensaures Ammoniak weit giftiger wirkt als kohlensaures Kali oder Natron. Das sollte zu denken geben.

[2]) In der Regel wurde noch mit 10 %igen Lösungen von Natriumnitrat oder Dikaliumphosphat geprüft, ob das Cytoplasma noch normaler oder anomaler Plasmolyse fähig sei; nur im positiven Falle ist noch Leben vorhanden.

ridin und Piperidin liefern bei 0,5 % eine Körnchenausscheidung, aber nicht mehr bei 10fach höherer Verdünnung (ersteres tötet bei 0,05 % die Zellen noch nicht in zwei Tagen, letzteres aber schon nach einigen Stunden).

Wenn eine 1 %ige Lösung von Hydrazinsulfat mit Kalkmilch bis zur alkalischen Reaktion versetzt wird, so bringt das Filtrat bald eine sehr starke Körnchenausscheidung in jenen Zellen zustande.

Ein ähnliches Resultat erhält man mit Hydroxylaminlösung von gleicher Verdünnung. Aber bei höheren Verdünnungen ist die Wirkung bedeutend schwächer.

In allen erwähnten Fällen entstehen feste Körnchen, die sich zu einer Art von Flocken vereinigen. Bei hochverdünntem Ammoniak ergibt eine sehr starke Vergrößerung, daß die ausgeschiedenen Körnchen anfangs flüssig sind, aber sehr bald erhärten. Wir nannten diese Ausscheidungen Proteosomen und fügten den Namen der Base zu, durch welche sie hervorgerufen wurden.

Die labile Eiweißmodifikation.

Wenn nun statt jener stark reagierfähigen Basen schwächere Basen verwendet werden, die weniger veranlagt sind, labile Atomgruppen zu zerstören, so zeigt sich ein wesentlich verschiedenes Bild[1]). Als solche Basen sind vor allem zu erwähnen Coffein und Antipyrin. Lösungen dieser Basen von 0,1 bis 0,5 % wirken nicht sofort tödlich auf die Zellen, die sogar 6 bis 8 Tage lang in solchen Lösungen lebendig bleiben können. Unter diesen Umständen bewahrt das durch diese Basen ausgeschiedene labile Eiweiß des Zellsaftes längere Zeit seine flüssige Form, an der nun die verschiedensten Beobachtungen leicht ausgeführt werden können. Die anfangs ausgeschiedenen minutiösen Tröpfchen vereinigen sich allmählich unter lebhafter Brownscher Molekularbewegung miteinander und es resultieren allmählich nach 1 bis 2 Stunden große, lichtbrechende Tropfen von mehr als dem halben Zelldurchmesser. Besonders geeignet ist zu diesen Versuchen die Art Spirogyra majuscula, welche sich dadurch auszeichnet,

[1]) Bei allen Versuchen mit Spirogyra ist nur aus Glasgefäßen destilliertes Wasser verwendbar. Gewöhnlich wurden die Versuche im zerstreuten Tageslicht bei Zimmertemperatur ausgeführt.

daß ihr Chlorophyllband nicht das Innere der Zelle so verdeckt, daß die Beobachtungen erschwert würden. Ferner speichert diese Art ganz besonders große Mengen des labilen Eiweißkörpers.

In einer 0,1 bis 0,5 $^0/_0$igen Coffeinlösung bleiben jene Tropfen tagelang glänzend und unverändert, und wenn diese Algenfäden dann in Wasser gelegt werden, so diffundiert allmählich (rasch bei 25°) das Coffein aus den Zellen wieder heraus und die glänzenden Tropfen werden wieder vollständig gelöst, ein Beweis, daß das Coffein nur äußerst locker gebunden war. Erneute Coffeinbehandlung ruft jene Ausscheidung wieder hervor. Bleiben aber die Algenfäden in der Coffeinlösung 6 bis 8 Tage und länger liegen, so sterben allmählich die Zellen ab, und bald darauf fangen auch die glänzenden Tropfen der Coffeinproteosomen an, sich zu verändern, sie bekommen viele kleine Hohlräume, die sich häufig zu einer einzigen Höhle vereinigen, und unter bedeutendem Wasserverlust geht nun der Eiweißkörper in einen festen, wasserunlöslichen Zustand über, d. h. er liefert durch eine langsam fortschreitende Koagulation die stabile Form jenes Eiweißkörpers: stabile Coffeinproteosomen. Aus dem glänzenden Tropfen ist eine feste, nicht mehr glänzende Hohlkugel entstanden, die man unter dem Mikroskop im Durchschnitt als einen mehr oder weniger breiten Ring erblickt, oder es resultiert eine feste Kugel von Schwammstruktur[1]). In Zellen, die auf irgendeine Art getötet waren. bringt Coffein keine Ausscheidung mehr hervor. Es wurde von uns bewiesen, daß jener Stoff beim Zellentod nicht etwa nach außen diffundiert. Es ist somit zu schließen, daß er in der Zelle selbst sehr bald nach dem Tod derselben auch verändert wurde[2]).

Will man nun das chemische Verhalten des labilen Eiweißstoffes genau prüfen, so ist vorauszuschicken, daß man seine Beobachtungen nur an sehr großen Coffeinproteosomen anstellen sollte, denn durch zu rasches Exosmieren von Coffein können

[1]) Diese koagulierten Proteosomen färben sich allmählich etwas gelblich, was einer Spur Gerbstoff zuzuschreiben ist, der sich ja stets gerne an Eiweiß heftet und der nun einer partiellen Oxydation unterliegt.

[2]) Läßt man eine verdünnte Jod-KJ-Lösung 4 Minuten auf diese Zellen wirken, so gibt nur ein Teil derselben noch Proteosomen mit Coffein; nach 10 Minuten keine einzige mehr. Der austretende Zellsaft gibt keine Proteosomen, sondern nur etwas gerbsaures Coffein, das sehr leicht löslich ist in verdünntem Alkohol, heißem Wasser oder Ammoniak.

kleine Proteosomen früher wieder gelöst werden, als eine Einwirkung des Reagenses auf die Proteosomen stattfinden kann. Auf diese Weise sind nämlich schon Täuschungen vorgekommen beim Behandeln mit starkem Alkohol oder sehr verdünnter Essigsäure, wobei sehr kleine Proteosomen rasch verschwunden sind, während an großen der Koagulationsvorgang sehr deutlich zu sehen ist.

Will man sich von der Eiweißnatur der Proteosomen überzeugen, so läßt man zuerst Millons Reagens einige Zeit bei gewöhnlicher Temperatur einwirken und erwärmt dann die natürlich koagulierten Proteosomen.

Die Biuretreaktion hat einige Schwierigkeiten, weil Kalilauge die Proteosomen zu leicht löst. Die mit Ammoniak fixierten Coffeinproteosomen eignen sich hierzu besser, aber die reine Farbenreaktion wird beeinträchtigt durch die Gelbfärbung der vorhandenen Spuren Gerbstoff.

Unzweifelhafte Schlüsse erlauben jedoch zahlreiche andere Beobachtungen, besonders aber die Koagulation der Proteosomen durch verdünnten Alkohol, durch Säuren und durch höhere Temperatur. Die Koagulation besteht hier entweder im Hohlwerden und Erstarren der Proteosomen oder kann auch mit der Umwandlung in ganz unförmliche flockige Massen enden.

Um die Koagulation durch Alkohol zu zeigen, legt man die Spirogyrafäden mit großen Coffeinproteosomen 3 bis 4 Stunden lang in 20 %igen Alkohol, der mit Coffein gesättigt ist[1]). Die Proteosomen sind dann in feste, unlösliche, unförmliche, oder auch wabige Gebilde verwandelt. Läßt man auf Spirogyrafäden, die teils labile und teils schon spontan-koagulierte Coffein-Proteosomen enthalten, absoluten Alkohol einwirken, so bleiben letztere ganz unverändert, erstere aber schrumpfen unter großem Wasserverlust zu einem geringen Niederschlag zusammen.

Die Koagulation durch höhere Temperatur gelingt leicht durch Eintauchen der Fäden in kochende Lösung von 4 %igem Chlornatrium. Um aber zu zeigen, daß unser labiler Eiweißstoff schon bei weit niederer Temperatur koaguliert, erhitzt man

[1]) In allen Fällen, in denen man eine Lösung längere Zeit auf die Proteosomen einwirken lassen will, ist der Flüssigkeit etwas Coffein zuzusetzen, um die Wiederauflösung der Proteosomen durch Exosmose des in die Zellen eingedrungenen Coffeins zu verhindern.

die Fäden in einer 2 %igen Chlornatriumlösung, die mit Coffein gesättigt ist, 5 Minnten auf 56°. Es resultieren dann Hohlkugeln oder ganz unförmliche Massen[1]). In konzentriertem Zustand koaguliert Hühnereiweiß ebenfalls bei 56°, in verdünntem aber erst bei 70 bis 73°.

Säuren wirken ziemlich rasch koagulierend; eine 5 bis 10 %ige Salpetersäure wirkt in wenigen Sekunden; eine 1 %ige in 5 bis 10 Minuten, die entstandenen häutigen Massen werden bei längerer Berührung mit der Säure allmählich gelöst (Acidalbuminbildung?). Ganz anders aber verhalten sich die vorher bei längerem Liegen in Coffeinlösung spontan koagulierten Proteosomen, sie werden selbst beim Aufkochen mit Salpetersäure von 10 % nicht gelöst. Rauchende Salpetersäure, reich an salpetriger Säure, koaguliert die Proteosomen momentan, und da, wo eine dickere Schicht der koagulierten Masse zu sehen ist, tritt sehr deutlich eine gelbe Färbung durch die Salpetersäure hervor. Eine 1 %ige Schwefelsäure koaguliert die Proteosomen in 10 bis 12 Minuten. Konzentrierte Essigsäure greift die spontan koagulierten Proteosomen nicht an, aber die labilen Proteosomen erleiden dadurch sofort Trübung, und nach etwa 15 Minuten ist Erstarrung erfolgt. Kleinere Proteosomen können sich auch ohne Vakuolisierung zu irregulären Massen umwandeln, die noch einen gewissen Glanz besitzen können.

Eine konzentrierte Lösung von Jod in Jodkalium bewirkt rasche Koagulation der Proteosomen, die nun eine rötliche Färbung annehmen; läßt man die Lösung jedoch warm einwirken, so resultiert eine rotgelbe Färbung der koagulierten Masse.

Eine Lösung von 0,2 % Kaliumhydroxyd koaguliert die labilen Proteosomen sehr rasch, ohne sie sofort zu lösen.

Silbernitrat von 0,1 % tötet die Zellen fast momentan und nach 15 bis 20 Minuten sind alle Proteosomen unter intensiver Trübung koaguliert, sie sind völlig undurchsichtig[2]). Eine 0,1 %ige Lösung von Kupfersulfat wirkt wesentlich langsamer

---

[1]) Erhitzt man längere Zeit auf 50°, so fängt allmählich die Koagulation schon bei dieser Temperatur an.

[2]) Hochverdünnte ammoniakalische Silberlösung wird bei längerer Berührung im Dunkeln durch die Proteosomen reduziert; auch gerbstofffrei gezüchtete Spirogyren verhalten sich so. Indessen, solange die Möglichkeit von verschiedenen reduzierenden Beimengungen besteht, sind Einwände nicht von der Hand zu weisen.

und es zeigt sich hier auch nicht jene intensive Trübung der koagulierten Kugeln. Noch langsamer wirkt verdünnter Bleiessig. Auffallend rasch aber wirkt eine Lösung von 0,1 %igem Sublimat.

Lösungen von 10 % neutraler Kali- oder Natronsalze, die rasch Plasmolyse der Zellen bewirken, führen auch zur langsamen Vakuolisierung der Proteosomen durch Wasserentziehung.

Formaldehyd von 5 bis 10 % wirkt nach momentaner Tötung der Zellen auch bald koagulierend auf die Proteosomen, die hierbei in ein Produkt verwandelt werden, das selbst in verdünnter Kalilösung nicht leicht löslich ist.

Werden frisch erzeugte Coffeinproteosomen mit einer konzentrierten Ammoniaklösung behandelt, so lösen sie sich nach einigen Minuten bis auf Spuren häutiger Masse auf, während die vorher spontan koagulierten Proteosomen selbst nach einiger Zeit nicht angegriffen werden. Wenn man jedoch 0,1 %ige Ammoniaklösungen auf labile Coffeinproteosomen wirken läßt, so entsteht sofort eine Trübung derselben, dann folgt eine Quellung mit häufiger Formveränderung, wobei manchmal ein Aufplatzen und Hervordringen des halbflüssigen Innern unter der bereits erstarrten Kugeloberfläche stattfindet, welche Masse nun ebenfalls langsam erstarrt. Eine Vakuolisierung findet hier nicht statt, wie bei vielen anderen Arten der Koagulierung. Diese, mit Ammoniak fixierten Coffeinproteosomen verhalten sich gegenüber manchen Solventien anders als die spontan in der Coffeinlösung koagulierten Proteosomen.

Werden 1 %ige Lösungen von schwefelsaurem Hydrazin oder Hydroxylamin mit Soda genau neutralisiert und Spirogyrafäden mit frischen Proteosomen eingelegt, so sind diese schon nach 15 Minuten geronnen und trübe und die Zellen tot.

Eine 2 %ige Blausäure wandelt die frischen Proteosomen bald in unlösliche Hohlkugeln um.

Dämpfe von Äther und Chloroform töten die Zellen sehr bald, und kurze Zeit darauf fangen auch die Proteosomen an zu koagulieren, dieser Vorgang schreitet aber hier nur langsam fort.

Hydrochinon und Chinon wirken bei 0,1 % in 3 Stunden koagulierend auf die Proteosomen. Ein kleiner Anteil der eingelegten Zellen ist aber zu dieser Zeit noch unverändert samt ihren labilen Proteosomen.

Resorcin, Brenzkatechin, Pyrogallol, Phloroglucin und

Guajacol lassen in 3 Stunden bei jener Konzentration die lebenden Zellen und die labilen Proteosomen so gut wie intakt, Phenol dagegen koaguliert sie in wenigen Minuten.

Wenn nun nach meiner Annahme in chemischer Beziehung derselbe Unterschied zwischen den labilen und stabilen Proteosomen existiert, wie zwischen den Eiweißmolekülen des lebenden und toten Protoplasmas, so müssen sich auch Analogien in bezug auf die Aufnahme von gewissen Farbstoffen ergeben. Nun färben sich nach mehreren Autoren die lebenden Zellen leicht mit basischen Farbstoffen, die toten aber mit sauren, was wohl im allgemeinen richtig ist, wozu aber doch auch manche Ausnahmen existieren. So führt z. B. B. Höber[1]) an, daß Opalina ranarum in lebendem Zustande nicht nur von basischen, sondern auch von sauren Farbstoffen gefärbt wird.

In dieser Beziehung machte ich nun folgende Beobachtungen: Der basische Farbstoff Methylviolett wird sowohl vom lebenden Cytoplasma als auch von den labilen Proteosomen aufgenommen, aber weder vom toten Protoplasma noch den stabilen Proteosomen. Ebenso verhält sich Cyanin. Für Methylrot läßt sich aber kein so charakteristischer Unterschied feststellen.

Chinon färbt labile Proteosomen gelb, stabile aber braun, wie die gewöhnlichen Eiweißkörper.

Martiusgelb wird von labilen Proteosomen selbst nach 4 Tagen nicht aufgenommen, während die stabilen Proteosomen es mit rötlicher Farbe aufnehmen.

Eine Lösung von Paraphenylendiamin von 1 $^0/_{00}$, frisch hergestellt, färbt, obwohl dieser Körper farblos ist, doch nach 3 Stunden die labilen Proteosomen hellblau (Indaminbildung?)[2]). Die stabilen Proteosomen produzieren die blaue Färbung nicht.

Nach Mosso[3]) färben sich lebende Zellen mit Methylgrün violett, tote aber grün. Er machte seine Versuche an Leukocyten, Flimmerepithel, Haaren von Tradescantia virginica und einigen anderen Objekten. Da aber das Methylgrün ziem-

---

[1]) Diese Zeitschr. 67, 420.

[2]) Es handelt sich bei dieser Farbstoffbildung um einen Oxydationsvorgang, den das labile Eiweiß herbeiführt. Eine beigemengte Oxydase kann hier kaum in Betracht kommen, da sie auch noch in den koagulierten Proteosomen vorhanden sein müßte.

[3]) Virchows Archiv 113, 47.

lich giftig ist, wandte ich eine äußerst verdünnte Lösung desselben an, nämlich eine im Verhältnis von 1 : 100000. Schon nach 4 Stunden läßt sich hier sehr schön konstatieren, daß die labilen Proteosomen schwach violett, die spontan umgelagerten aber grün gefärbt sind. Viel intensiver sind jedoch diese Färbungen, wenn man die Probe 24 Stunden stehen läßt[1]). Bei dieser Violettfärbung handelt es sich um eine chemische Aktion, durch die aus dem Methylgrün Chlormethyl abgespalten und die Muttersubstanz desselben, das Methylviolett, regeneriert wird. Die labilen Proteosomen können hier also dieselbe chemische Aktion ausführen, wie das lebendige Protoplasma. Die mit Ammoniak fixierten Coffeinproteosomen sind dieser chemischen Aktion ebensowenig fähig wie die koagulierten Proteosomen, sie färben sich grün.

Ruzika[2]) schlägt zur Unterscheidung lebender von toten Zellen ein Gemisch von Neutralrot und Methylenblau vor. Die lebenden Zellen nehmen das Neutralrot, die toten aber das Methylenblau auf. In vollkommener Analogie verhalten sich auch die labilen und stabilen Proteosomen. Die labilen nehmen aus der hochverdünnten Lösung dieses Farbstoffgemisches das Neutralrot[3]), die stabilen aber das Methylenblau auf. Es macht hier keinen Unterschied, ob die Proteosomen spontan koaguliert waren, oder durch Erwärmen, oder Behandeln mit Essigsäure. Nur die mit Ammoniak fixierten Proteosomen nehmen ebenfalls Neutralrot auf, wie die labilen, zum Unterschied von den in anderer Weise veränderten Proteosomen. Diese beiden Farbstoffe sind basischer Natur, aber es existiert doch ein Unterschied im Grade der Basicität. Auch mag die verschiedene Konfiguration einen Unterschied in der Adsorptionsfähigkeit bedingen.

Das verschiedene Verhalten der mit Ammoniak fixierten Proteosomen zu den Reagenzien von Mosso und von Ruzika ist recht wohl erklärlich. Die Adsorption von Neutralrot beruht nicht auf einer chemischen Veränderung wie die Violettfärbung

---

[1]) Einzelne Proteosomen, die sich vielleicht während der Färbung umlagerten, färbten sich blau.

[2]) Arch. f. d. ges. Physiol. **107**, 497.

[3]) Bei tierischen Objekten, nämlich Leukocyten, beobachtete F. Winkler, daß die in denselben durch Coffeinlösung hervorgerufenen Granulationen im frischen Zustande ebenfalls intensiv Neutralrot speichern.

durch Methylgrün. Die Adsorption von Neutralrot wird, wie es scheint, lediglich durch eine stärker basische Natur der Eiweißkörper bedingt, während das Methylenblau von Eiweißkörpern aufgenommen wird, deren basische Natur abgeschwächt ist. Man darf bei dieser Beurteilung nicht außer acht lassen, daß viele Farbstoffe nicht freie Basen, sondern Salze von Leukobasen sind, also die basische Natur neutralisiert ist.

Beim Aufenthalt von eiweißreichen Objekten im Dunkeln wird nach dem Verschwinden der gespeicherten Kohlenhydrate auch das aktive Eiweiß angegriffen und die Zahl der mit Coffein reagierenden Zellen nimmt immer mehr ab. Das Endresultat dieses Eiweißzerfalls ist, wie bei der Keimung, Asparagin. So fand Daikuhara (Flora 1895, 95), daß bei Blättern von Quercus glandulifera der Asparaginstickstoff von 0,2 auf 0,6 $^0/_0$ nach 12 Tagen Dunkelheit gestiegen war, bei Paeonia albiflora von 0,279 auf 1,211 $^0/_0$ in 25 Tagen. Der Tod der Zellen war nahe, aber noch nicht eingetreten.

Bokorny und ich haben gezeigt, daß der durch Basen ausscheidbare Eiweißstoff in den Zellen die Rolle eines Speicherungsproduktes spielt; denn bei Züchtung von eiweißreichen Spirogyraarten in einer stickstofffreien, aber sonst vollständigen Nährlösung am Licht wird unter fortdauerndem Wachstum dieser Algen dieser gespeicherte Eiweißkörper völlig verbraucht, so daß gar keine Reaktion mehr auf denselben erhalten wird, obwohl eine Lösung von 0,5 $^0/_0$ Coffein oder 1 $^0/_{00}$ Ammoniak sehr kleine Mengen dieses Stoffes leicht erkennen läßt. Umgekehrt zeigten wir auch, daß dieser Eiweißkörper zur Speicherung in erheblichem Maße gebracht werden kann durch Anwendung einer Nährlösung, die keine Phosphate enthält, aber sonst vollständig ist. Auf diese Weise wurde die Zellteilung hintangehalten und das gespeicherte Eiweiß konnte nicht durch Vermehrung der Zellen wieder verbraucht werden und mußte sich ansammeln.

Aber die innigste Beziehung von unserem labilen Eiweißstoff zu den Eiweißstoffen des lebendigen Protoplasmas wird noch schlagender dadurch bewiesen, daß auch das lebende Protoplasma selbst bei sehr vielen Objekten mit Coffein unter Wasserausstoßung und Vakuolisierung reagiert, ohne dabei sofort

abzusterben. So beobachtete Bokorny[1]) bei Behandlung eines Myxomyceten mit 0,1 $^0/_0$ iger Coffeinlösung die Bildung von verschieden großen, runden Portionen unter starker Protoplasmaströmung, worauf eine Sonderung in stark lichtbrechendes Plasma und eine Vakuole vor sich ging.

Bei Amöben führt diese Behandlung zur Entstehung zahlreicher Vakuolen, und die nun dichter gewordene Cytoplasmamasse bewegte sich allmählich langsamer als zuvor, und die Fortsätze wurden länger und dünner. Beim Ersatz der Coffeinlösung durch Wasser stellte sich allmählich der ursprüngliche Zustand wieder her und die Amöbe lebte weiter. Paramäcien zeigen bei dieser Behandlung anfangs bedeutende Beschleunigung der Wimperbewegung, sodann ein Auftreten von Vakuolen und so eigenartige Contractionen, daß man meinen könnte, es hätte eine andere Infusorienform sich gebildet.

Aber nicht nur das halbflüssige Cytoplasma solcher Organismen, sondern auch festere Protoplasmastrukturen können mit Coffein reagieren, insofern durch eine 1 $^0/_{00}$-Lösung dieser Basis bei manchen Objekten sowohl normale als anomale Plasmolyse auftreten kann, wobei die Wände des Cytoplasmas als gespannte Blasen noch längere Zeit am Leben bleiben. Offenbar resultiert diese Erscheinung lediglich als Folge einer leichten Reizwirkung, infolgederen eine Wasserabscheidung eintritt. Die Ursache der Plasmolyse ist hier eine ganz verschiedene, als bei Anwendung einer 5- bis 10 $^0/_0$ igen Lösung eines neutralen Kali- oder Natronsalzes.

Bei Spirogyra tritt die Plasmolyse durch Coffein nur selten ein, aber sehr leicht, wie Bokorny[2]) gezeigt hat, bei den Zellen der Blüten von Ipomaea und Crocus, Blättern von Camellia und Blattnerven von Pyrus Toringo, bei der Rinde junger Zweige von Aesculus turbinata, Blumenblättern von Tulipa, von Blütenstielen von Primula sinensis. Sehr häufig treten hier innerhalb des plasmolysierten gespannten Tonoplasten viele Kugeln von Coffeinproteosomen auf. Ebenso wie bei der Bildung der Proteosomen eine teilweise Abtrennung von locker gebundenem Wasser aus dem gelösten aktiven Eiweiß stattfindet, beruht die Plasmolyse durch Coffein auf

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. **137**, 487; Arch. f. Zellforschung **7**, Heft 1.
[2]) Arch. f. d. ges. Physiol. **45**, 209; ferner Daikuhara, Flora **1895**, 95.

einer Abtrennung eines gewissen Anteils des gebundenen Wassers aus den festen Cytoplasma-Membranen.

Am kompliziertesten sind solche Vorgänge bei manchen insektenfressenden Pflanzen, wo Coffein nicht nur Proteosomenausscheidung, sondern zugleich Plasmolyse herbeiführt. Und da die Zellen dieser Pflanzen einerseits sehr eiweißreich sind und andererseits sehr wahrscheinlich durch zahlreiche Plasmabrücken ausgiebig miteinander verbunden sind, so pflanzt sich der einmal eingetretene Reiz langsam weiter fort auf andere Teile derselben Pflanze, die nicht direkt mit dem Coffein in Berührung kamen. Aber bei diesen Objekten ist die ganze Frage sehr kompliziert; denn auch geringe minimale Reize anderer Art bringen jene Erscheinungen zustande, die zuerst von Darwin beschrieben und mit dem Namen „Aggregation“ belegt wurde [1]).

Was die Verbreitung dieses labilen Eiweißstoffes betrifft, so ist dieselbe eine sehr große, und es bleibt noch zu entscheiden, ob nicht vielleicht die Mehrheit der Pflanzen dasselbe im einen oder anderen Organ gespeichert enthält. Auch solche Pflanzen, die wegen sehr raschen Wachstums es nicht speichern können, enthalten es doch öfters in ihren Drüsenhaaren, wie z. B. Vicia Faba in den Drüsenhaaren der jungen Blätter. Bei verschiedenen Pflanzen ist es in den Laubblättern, bei andern in den Blütenteilen oder in der Rinde und Markstrahlzellen oder auch in Wurzeln von Bokorny, Daikuhara und mir aufgefunden worden. Besonders reich daran sind die insektenfressenden Pflanzen und Gruppen der Rosiflorae, Juliflorae, Saxifragineae, Myrtiflorae und Aesculineae. Manchmal treten Proteosomen spontan auf, die mit frischen Coffeinproteosomen die größte Ähnlichkeit haben, so in chlorotischen Blättern von Acer oder in den Blättern von Prunus [2]) bei längerem Verweilen im Dunkeln.

In tierischen Objekten ist ein ähnlicher Körper von Ferd. Winkler [3]) in Leukocyten beobachtet und mit Coffein zur Abscheidung gebracht worden.

---

1) Siehe hierüber auch Th. Bokorny, Pringsheims Jahrb. **20**, 431.

2) Flora **1895**, 90, und O. L., Die chem. Energie der lebenden Zellen, 2. Aufl., Kap. 7.

3) Fol. haematol. **1910**.

Zusammenfassung.

In vielen Pflanzenzellen kommt ein sehr labiler Eiweißkörper gespeichert vor, gewöhnlich im Zellsaft, bei manchen Objekten aber auch im Cytoplasma. Dieser Eiweißkörper unterscheidet sich hauptsächlich dadurch vom gewöhnlichen Eiweiß, daß er mit Ammoniak und organischen Basen aus seiner Lösung abgeschieden wird und dabei in der Regel eine rasche Veränderung zu einer stabilen Verbindung erfährt. Diese Abscheidung beruht nicht auf einem Neutralisationsvorgang. Während in der Regel durch sehr reagierfähige Basen zahlreiche sehr kleine Granula abgeschieden werden, wirken schwache Basen wie Coffein und Antipyrin wesentlich verschieden. Solche Basen können nicht nur das Leben der Zellen tagelang intakt lassen, sondern auch den labilen Charakter des gespeicherten labilen Eiweißes. Die anfangs ausgeschiedenen minimalen Tröpfchen vereinigen sich allmählich zu ansehnlichen lichtbrechenden großen Tropfen, die oft die Hälfte des Zelldurchmessers besitzen und 30 μ im Durchmesser erreichen können; an diesen Gebilden (Coffein-Proteosomen) kann nun jede Veränderung durch einwirkende Stoffe sehr leicht unter dem Mikroskop verfolgt werden. Die Koagulation derselben besteht in der Ausstoßung von Wasser und Unlöslichwerden, wobei entweder eine mehr oder weniger Hohlräume besitzende feste Kugel, eine Hohlkugel oder auch eine amorphe unförmliche Masse resultiert. Von besonderem Interesse ist, daß auch Blausäure, Hydroxylamin und Hydrazin solche Erscheinungen herbeiführen. Bei Aufnahme von Ammoniak dagegen findet ein Erstarren meist ohne Bildung von Hohlräumen statt.

Dieses labile aktive Eiweiß verhält sich gegen Farbstoffe wie das lebende Protoplasma, während die durch Wärme, Säuren, Alkohol oder auch spontan koagulierten Proteosomen sich wie abgestorbenes Protoplasma gegen Farbstoffe verhalten.

Der innige Zusammenhang zwischen dem gespeicherten labilen Eiweiß und dem organisierten labilen Eiweiß oder lebenden Protoplasma wurde auf mehrfache Art erwiesen.

Weitere Beiträge zur Frage der organischen Ernährung grüner Blütenpflanzen.

Von

Th. Bokorny.

(Eingegangen am 10. Juli 1916.)

Einleitende Bemerkungen. Fleischfressende Pflanzen, einige eigene Versuche an Pinguicula vulg.

Unser Blick wendet sich zunächst auf die in ernährungsphysiologischer Beziehung so interessanten fleischfressenden Pflanzen. Denn sie können sich nachgewiesenermaßen von organischen Stoffen ernähren, wenn sie auch nicht ausschließlich auf diese Nahrung angewiesen sind; sie haben auch chlorophyllführende Organe.

Die organische Ernährung scheint ziemlich ausgiebig zu sein.

Ch. Darwin war im Sommer 1860 erstaunt, als er sah, wie eine große Anzahl Insekten von den Blättern des gewöhnlichen Sonnentaus auf einer Heide in Sussex gefangen wurden. Auf einem großen Blatt fand er die Reste von 13 größeren Insekten, meist Fliegen. Von 56 ganz ausgebreiteten Blättern klebten an 31 tote Insekten oder die Überreste von solchen. An einer Pflanze hatten alle 6 Blätter ihre Beute gefangen. D. berechnet, daß die Anzahl der auf diese Weise getöteten Insekten ganz ungeheuer sein muß, wenn die Drosera, wie manchmal der Fall, ganz gemein vorkommt. Ferner vermutet er, daß die fleischfressende Pflanze hiervon einen Nutzen habe, da sie zum Insektenfang so ungemein geschickt eingerichtet ist und eine Auflösung des Insektenleibes faktisch beobachtet wird. Auch treten im Innern der Tentakelzellen auffallende Veränderungen ein, wenn die Drüsen durch Insekten oder in anderer Weise gereizt werden.

Es erfolgt eine Zusammenballung des lebenden Protoplasmas, die, wenn der Reiz aufhört, von selbst wieder zurückgeht.

Genauere Untersuchung dieser Begleiterscheinung jener merkwürdigen organischen Ernährung von Blättern haben gezeigt, daß es stickstoffhaltige basische Stoffe sind, die jenen Reiz hervorrufen. Auflegen von Fleischstückchen, Eiweißpartikeln usw. oder auch Betupfen mit sehr verdünnten Lösungen von kohlensaurem Ammoniak ruft, wie schon Darwin erkannte, die Erscheinung ebensogut hervor, wie Berührung mit gefangenen Insekten. Sie tritt nur ein, wenn die Tentakelzellen lebendig sind, und besteht in einer von Zelle zu Zelle fortschreitenden „Aggregation“ [1]), d. i. einer Bildung von Eiweißkugeln, teils im Zellsaft, teils im Plasma. Alle untersuchten basischen Stoffe, wie Ammoniak, kohlensaures Ammon, Kali, Natron, Koffein, Antipyrin, Toluidin usw., rufen bei entsprechend hoher Verdünnung die Aggregation hervor. Die Aggregation wurde vom Verfasser dann noch bei zahlreichen anderen Pflanzenzellen aufgefunden, wenn sie auch wohl nirgends so leicht eintritt wie bei Drosera. Z. B. an den Zellen der Narbenpapillen von Crocus vernus ballt sich das gesamte Cytoplasma zusammen, wenn 0,1 $^0/_0$ Coffeinlösung einwirkt; das von der Zellhaut zurückweichende Cytoplasma umgibt sich an seiner Außenfläche mit Cellulose, so daß nun eine zweite neue und engere Zellhaut in der älteren steckt, woraus auch klar hervorgeht, daß der Vorgang an der lebenden Zelle sich abspielt. Sonst wäre eine Neubildung von Zellhaut nicht möglich.

Die ausgeschiedenen Ballen sind Eiweiß mit Wasser (als Quellungsmittel), aber von geringerem Wassergehalt als vorher, wie schon aus der stärkeren Lichtbrechung hervorgeht; in den Zwischenräumen zwischen den Ballen liegt die ausgeschiedene wässerige Flüssigkeit.

Es ist sehr wohl möglich, daß dieselbe bei Drosera die verdauenden Enzyme enthält, und daß die Ballung verbunden mit Wasserausscheidung zu dem Zwecke erfolgt, um Enzymlösungen nach außen zu befördern und damit eine Verdauung der gefangenen Beute zu ermöglichen. Vielleicht hängt sie auch mit der Aufsaugung zusammen.

Fleischfang wurde von Darwin dann auch bei vielen Arten von Utricularia aufgefunden. Sie sind dazu wunderschön

---

[1]) Bokorny, Über Aggregation, Vortr. phys.-med. Soz., Erlangen 1890 und Pringsh. Jahrb. wiss. Bot. 20, Heft 6.

angepaßt und saugen die Produkte von deren Zerfall auf; Verdauungssäfte besitzt aber Utricularia nicht (Ch. D.), ebensowenig Sarracenia und Darlingtonia. Mit Drosera stimmen hingegen wiederum Pinguicula und Nepenthes in bezug auf Absonderung von Verdauungssäften überein. Sie sind am meisten tierähnlich in bezug auf Ernährung.

Unter „Produkten des Zerfalls" versteht Ch. Darwin wohl zweifellos die infolge von Bakterienzersetzung auftretenden Stoffe.

Sie sind von sehr verschiedener Art und bestehen wohl zum Teil aus Stoffen, mit denen ein tierischer Darm und Magen nichts anzufangen wüßte, wie z. B. Ammoniak. Diese Ernährung schließt schon teilweise an die gewöhnliche Pflanzenernährung aus einfach gebauten Stoffen an.

Ist denn überhaupt die zweifellos stattfindende Ernährung der fleischfressenden Pflanzen mit Tieren oder deren Fäulnisprodukten vorteilhaft für diese? Was nützt der Tierfang, wenn die fleischfressenden Pflanzen auch ohne organische Nahrung, nämlich von der Kohlensäure der Luft leben können? Oder sollte diese Ernährung hier nicht ausreichen?

Darüber kann nur das Experiment entscheiden. Leider fehlt es an solchen Experimenten ziemlich stark. Ich finde eine Angabe über Versuche von Büsgen. Er beobachtete Utricularia mit und ohne Flohkrebsfütterung. Im letzteren Falle wurden deutliche Symptome von Hunger[1]) beobachtet. Hingegen gedeiht Utricularia bei reichlicher Flohkrebsfütterung sehr gut.

Bei Drosera fand Büsgen einen beträchtlichen Unterschied hinsichtlich des Trockengewichtes der Fruchtkapseln. Gefütterte standen zu nichtgefütterten im Verhältnis 3 : 1 oder gar 5 : 1.

Man zieht nun aber aus diesen Beobachtungen und aus dem ganzen Verhalten der fleischfressenden Pflanzen merkwürdigerweise nicht den Schluß, daß ihnen organische Ernährung nötig oder doch sehr vorteilhaft sei; einen Schluß, den gewiß viele Unbefangene ziehen werden. Vielmehr fahndet man nach einer ganz anderen Deutung der Insectivorie.

Die organische Ernährung wird als etwas Untergeordnetes hingestellt, zumal ja in neuester Zeit die Möglichkeit, organische Stoffe zur Ernährung zu verwenden, auch für viele

[1]) Z. B. verfrühte Bildung von Winterknospen.

andere Pflanzen nachgewiesen wurde. Man bedenkt dabei nicht, daß die organische Ernährung ja allerdings eine niedere Stufe der Ernährung darstellt, daß sie aber bei einer großen Gruppe von Pflanzen, den Pilzen, die einzige Ernährungsart ist. Es hat somit nichts Ungereimtes an sich, wenn man angesichts der gefüllten Kannen von Nepenthes mit ihren zahlreichen gefangenen Asseln und anderen Tieren[1]), ferner der fliegen- und mückenbedeckten Droserablätter zunächst die pilzähnliche, ja sogar tierähnliche Ernährung bestaunt.

Nepenthes war lange Zeit der Gegenstand erregter Diskussionen, bis durch Höbel und Vines nachgewiesen werden konnte, daß peptonisierende Enzyme in den Kannen gebildet werden. Allerdings ist die Menge derselben verschieden.

Bei schwächlichen Pflanzen ist die Verdauungsflüssigkeit der Kannen neutral, so daß sich reichlich Mikroorganismen an den Tierleichen entwickeln können.

Lebenskräftige Kannen dagegen enthalten eine stark saure und lebhafte verdauende Flüssigkeit, in der Mikroorganismen nicht aufkommen.

Kräftige, aber noch geschlossene Kannen enthalten eine neutrale Flüssigkeit; es genügt aber (nach Clautriau), die Kannen nur zu schütteln oder Glassplitter hineinzuwerfen, um die Säurebildung zu veranlassen.

Auch kann durch künstlichen Zusatz von Säure die Enzymbildung angeregt werden. In der Natur wird das erste in die Kanne fallende Insekt den Anstoß zur Säureausscheidung und damit zur Enzymausscheidung geben.

Freilich kommt es vor, daß bei Überfütterung der Kannen die Säure nicht ausreicht (sie wird durch basische Zerfallsprodukte fortwährend neutralisiert) und dann wird die Entwicklung von Fäulnisbakterien nicht ausbleiben.

Auf eine merkwürdige, aber sehr sinnreiche Abhängigkeit der Enzymsekretion von äußeren Umständen hat kürzlich Fenner aufmerksam gemacht. Danach ist Benetzung der Drüsen mit der Kannenflüssigkeit Vorbedingung zu lebhafter Sekretionstätigkeit. Dieser Fall tritt aber in der Natur stets ein, wenn

[1]) Nepenthes Raja in Borneo soll so große Kannen haben, daß sogar kleine Wirbeltiere in ihrem Kanneninhalt ertrinken könnten.

benetzte — noch lebende — Insekten zu entkommen und an der Wand emporzukriechen suchen, wobei sie mit ihren benetzten Gliedmaßen die Drüsen berühren, oder wenn schon erstickte, auf der Flüssigkeit schwimmende Insektenkörper — vielleicht infolge der Kapillarwirkung — an die Kannenwände stoßen und so die dort befindlichen Drüsen reizen.

Auf die höchst merkwürdigen, bewundernswerten Fangvorrichtungen sei hier nicht eingegangen. Man liest ja genug von den „Fallen“, „Wolfsgruben“, „Schleim- und Leimausscheidungen“, der sich die Insectivoren bedienen.

Trotz alledem soll es nun den fleischfressenden Pflanzen gar nicht um Fleisch zu tun sein, sondern um — Salze!

Das sei Ursache und Sinn der Insektivorie.

„Mit dem besseren Einblick in die Ernährungsvorgänge bei grünen und nichtgrünen Pflanzen verlor die Vorstellung von der Aufnahme fertig gebildeter Eiweißstoffe durch Verdauung gefangener Tierkörper viel von ihrer Unwahrscheinlichkeit, und als man ferner erkannte, daß zum Aufbau von Eiweißsubstanzen gewisse anorganische Stoffe, wie Phosphor, Stickstoff, Schwefel u. a., die alle unter normalen Verhältnissen aus dem Boden aufgenommen werden, notwendig sind, gewann dies, da die meisten Carnivoren ihren natürlichen Standort auf nährsalzarmem Boden (Moor) haben, eine höhere Bedeutung.“ So liest man in einem bekannten Werke.

Ich muß gestehen, daß mir die erwähnte Anschauung recht absonderlich erscheint.

Wer möchte denn der Behauptung Glauben schenken, daß die Tiere Fleisch fressen müssen, um Salze zu erhalten?

Es kommt ihnen offenbar auf die Eiweißstoffe desselben an, durch diese werden sie ernährt.

Salze sind freilich auch nötig, aber nur in relativ kleiner Menge. Sie können meist auch aus anderer Quelle genügend bezogen werden.

Bekanntlich beziehen die Pflanzen ihr Ca, K, Mg, Fe, PO_4 aus dem Boden.

Das mag nun bei den auf mineralstoffarmen Mooren gewachsenen fleischfressenden Pflanzen etwas schwierig sein.

Dafür steht aber mineralischer Staub zur Verfügung, der durch Winde herbeigeführt wird.

Man fragt sich auch bei dieser Hypothese vergeblich, wie denn nachher die das Moor bildenden, seine Oberfläche belebenden Moospflanzen zu ihrem Kalk, Kali usw. gelangen, da sie keine Fleischfresser sind.

Mag sein, daß sie ein geringeres Kalk- und sonstiges Mineralstoffbedürfnis haben als viele andere Pflanzen; bedürfen werden sie dieser Stoffe auch, sie müssen auf irgendeine Weise herbeigeschafft werden.

Da nun der Moorboden arm daran ist, so muß wohl eine Versorgung durch atmosphärischen Staub eintreten.

Derselbe kann aber auch den fleischfressenden Pflanzen Mineralnahrung verschaffen.

Kurz, es ist kein Grund vorhanden, von der naturgemäßen Auffassung abzugehen, daß die Insektivoren Tiere fangen und verdauen, um zu organischer Nahrung zu gelangen und damit die schwierigere Kohlensäure-Assimilation mehr oder weniger überflüssig zu machen.

Das Vorkommen in Mooren kann auch andere Gründe haben.

Ferner gibt es ja auch gewiß fleischfressende Pflanzen auf mineral- und kalkreichem Boden.

So kann man die Pinguicula vulgaris im bayrischen Kalkgebirge überall auf feuchteren Wiesen, Hohlwegen usw. antreffen.

Sie bedarf der Insekten sicherlich nicht als Mineralstoffträger.

Eigene Versuche mit Pinguicula vulgaris.

Eine größere Anzahl von Pinguiculapflanzen wurden mit unterliegendem Rasen auf einer Bergwiese des Kufsteiner Inntales ausgehoben und — nach 3 tägiger Lagerung in einer Botanisierbüchse (da eine Verpflanzung nicht eher möglich war) — in Töpfe mit Gartenerde gesetzt. Die Gartenerde war von recht mittelmäßiger Qualität.

Mehrere der Pflanzen waren bereits vergilbt, als sie in die Töpfe kamen, doch erholten sie sich teilweise wieder.

Das scheint auf einen ziemlich raschen Stoffwechsel bei diesen Pflanzen hinzuweisen.

Die mikroskopische Untersuchung eines solchen vergilbten Blattes ergab zahlreiche runde, sitzende und runde, langgestielte, hutpilzähnlich geformte Drüsen auf der Blattoberseite.

Auch an einem jüngeren, halb so kleinen Blatte (die Länge

des ausgewachsenen betrug 3 cm), das noch vollkommen frisch und grün war, konnten genau dieselben drüsigen Gebilde wahrgenommen werden; hier waren sie aber durchaus im lebenden Zustande, während am älteren Blatte schon manche abgestorben waren.

Bei Einwirkung von gesättigter 1 $^0/_0$ iger, wie auch von 0,1 $^0/_0$ iger Coffeinlösung bemerkte ich beiderseits keine Aggregationserscheinungen.

Ebenso traten keine Aggregationserscheinungen auf, als ich 0,025 $^0/_0$ ige oder auch 0,1 $^0/_0$ ige Ammoniaklösung einige Zeit einwirken ließ.

Ferner blieb eine 2 $^0/_0$ ige Peptonlösung wirkungslos, d. h. eine Ballung des Zellinhaltes kam nicht zustande. Freilich manche Drüsen zeigten Absterberscheinungen (Contraction und Trübung des Plasmas).

Ein Versuch mit Eieralbumin, von dem eine kleine Menge zusammen mit einem Töpfchen Wasser auf das Pinguiculablatt gebracht wurde, ergab wiederum negatives Resultat. Ich sah, als das Blatt nach 15 Stunden untersucht wurde, keine Spur von Aggregation. Auch wies das Blatt makroskopisch keinerlei Reizzustände auf.

Die Versuche fielen immer negativ aus, ob nun abgetrennte Blätter oder an der Pflanze befindliche geprüft wurden, nur kurze Zeit oder mehrere Stunden, sogar Tage dauerten.

Darwin gibt speziell von dem kohlensauren Ammoniak an, daß dasselbe an Pinguicula ähnliche Wirkungen wie ein Insekt oder ein Stückchen Fleisch ausübe.

Er sagt hierüber (a. a. O. S. 346 und 347): „Zwei Stückchen Blatt wurden 17 Stunden lang, ein jedes in eine Drachme einer Lösung von kohlensaurem Ammoniak von 2 Stärkegraden gelegt, nämlich von 1 Teil auf 347 und auf 218 Teile Wasser. Die Drüsen der längeren und kürzeren Haare wurden dann untersucht und dabei ergab sich, daß ihr Zelleninhalt zu einer körnigen Masse einer bräunlich-grünen Farbe zusammengeballt war, die langsam ihre Form änderten. Ohne Zweifel bestanden sie aus Protoplasma. Innerhalb der Drüsen des Blattstückes, das der Wirkung der stärkeren Lösung ausgesetzt war, war die Zusammenballung stärker ausgesprochen und die Bewegung des Protoplasmas rapider als in den andern. Das Experiment wurde mit demselben Resultate wiederholt, und dabei bemerkte

ich, daß das Protoplasma ein wenig von den Wandungen der einzelnen verlängerten, die Stiele bildenden Zellen abgeschrumpft war. Um den Prozeß der Zusammenballung zu beobachten, wurde ein schmaler Streifen eines Blattes auf der Kante liegend unter das Mikroskop gebracht; die Drüsen zeigten sich völlig durchsichtig. Nun wurde ein wenig von der stärkeren Lösung (1 : 218) unter das Deckgläschen gegeben; nach 1 bis 2 Stunden enthielten die Drüsenzellen sehr feine granulöse Substanz, die langsam grobkörniger und unbedeutend opak wurde; aber selbst nach 5 Stunden war sie noch nicht bräunlich. Um diese Zeit erschienen einige wenige große, durchscheinende, kugelige Massen innerhalb der oberen Stielzellen, auch war das ihre Wandungen auskleidende Protoplasma ein wenig zusammengeschrumpft. Es geht sonach hieraus hervor, daß die Drüsen der Pinguicula kohlensaures Ammoniak absorbieren; sie absorbieren es aber nicht so schnell als die Drüsen der Drosera, oder es wirkt nicht so schnell auf sie ein als wie dort.“

Eine Wiederholung dieser Versuche meinerseits ergab nun absolut negatives Resultat, auch wenn die Pflanze 20° warm gestellt wurde, so daß ich zunächst die Versuche aufgab. Vermutlich befanden sich meine Pflanzen (Ende Oktober) in einer Art Starre und waren überhaupt nicht reizbar.

Die Herbsttage 1913, in denen diese Versuche gemacht wurden, waren durchaus trüb, kalt und regnerisch. Vermutlich war also die Zeit nicht günstig.

Ich beschränke mich auf einige mikrochemische Versuche.

Die obere Fläche der Blätter von Pinguicula vulgaris ist, wie schon Ch. Darwin (insektenfressende Pflanzen) angibt, dicht mit Drüsenhaaren von zweierlei Art bedeckt, die in der Größe der Drüsen und der Länge ihrer Stiele voneinander abweichen.

Die größeren Drüsen haben einen kreisförmigen Umfang, wenn sie von oben betrachtet werden, sind mäßig dick, werden durch strahlenförmig angeordnete Scheidewände in 16 Zellen geteilt, die eine hellgrüne homogene Flüssigkeit enthalten. Sie werden von länglichen, einzelligen Stielen mit Kern und Kernkörperchen in der einen Stielzelle getragen; die Stiele stehen auf leichten Hervorwölbungen.

Die kleinen Drüsen weichen darin ab, daß sie nur von der halben Anzahl von Zellen gebildet werden, die viel

blässere Flüssigkeit enthalten und von viel kürzeren Stielen getragen werden.

Nahe der Mittelrippe nach der Basis der Blätter zu sind die Stiele vielzellig, länger als irgendwo anders und tragen kleinere Drüsen.

Alle Drüsen sondern eine farblose, klebrige Flüssigkeit ab.

Der scharfe Blattrand ist durchscheinend und trägt keinerlei Drüsen.

In der Absonderung klebriger Flüssigkeit aus den Drüsenköpfen erkennt man eine Ähnlichkeit mit den Droserablättern.

Doch scheint die Reizbarkeit der Drüsenhaare sehr stark zu differieren.

Ich konnte, wie gesagt, bei keinem meiner Pinguicula-Versuche eine Zusammenballung des Inhaltes oder eine Körnung bemerken, während die Drüsenhaare von Drosera äußerst leicht reagieren, so daß man in ihrer Behandlung vorsichtig sein muß, um keine unbeabsichtigte oder gar schädliche Wirkung zu erzielen.

Als die Witterung sich einigermaßen besserte, stellte ich noch folgende Versuche auf:

Versuch 1.

Kontrollversuch. Die Pinguilapflänzchen wurden mit gewöhnlicher mineralischer Nährlösung begossen.

Sie wiesen binnen 14 Tagen keine nennenswerte Entwicklung auf.

Reizmittel verursachten keine Wirkung.

Offenbar war die Zeit zu Ernährungsversuchen nicht geeignet.

Im Herbst schicken sich ja unsere Pflanzen an, in das Stadium der Winterruhe überzugehen.

Sie arbeiten dann nicht mehr.

Sogar bei günstigeren Witterungsverhältnissen konnte ich früher schon wiederholt beobachten, daß die Ernährungsversuche in solcher Jahreszeit recht ungünstig verliefen.

Versuch 2.

Asparagin 0,5 % + Monokaliphosphat 0,05 % + Magnesiumsulfat 0,05 % + Calciumchlorid 0,05 % + Spur Eisen, alles in destilliertem Wasser gelöst.

Mit dieser Asparagin als organische Stickstoff- und Kohlenstoffquelle enthaltenden Lösung wurden die Pinguiculapflänzchen begossen.

Auch sie wiesen binnen einigen Wochen keine nennenswerte Entwicklung auf und ließen auch keine Reizbarkeit erkennen.

Versuch 3.

Asparagin 0,5 % + Monokaliphosphat 0,05 % + Magnesiumsulfat 0,02 % + Calciumnitrat 0,05 % + Spur Eisen; alles in destilliertem Wasser gelöst.

Diese Nährlösung enthält Asparagin als Kohlenstoffquelle. Für die Stickstoffernährung der Pinguiculapflänzchen war noch eigens Calciumnitrat zugesetzt.

Nach einigen Wochen zeigte sich keinerlei Erfolg.

Ich stand also von weiteren Versuchen mit Pinguicula in jenem Herbste ab.

Künstliche Methylalkohol-Ernährung.

Versuche mit Brassica oleracea (Var-Wirsing) und Methylalkohol.

Es wurde eine Anzahl kleine Wirsingpflanzen von einer Gärtnerei bezogen (15. März).

Dieselben hatten die Höhe von 10 cm und wurden zum Versuch so ausgewählt, daß sie von gleicher Entwicklung und Kräftigkeit der Organe waren.

Ihr Gewicht betrug je 2 g.

Dieselben wurden je in einen Topf mit Gartenerde gepflanzt. Der Topf enthielt nur eine Pflanze und war sehr geräumig, etwa 10 kg Gartenerde fassend.

Die Pflanzen wurden regelmäßig, des Tages 1- bis 2 mal begossen, alle gleich. Der Aufenthaltsort der Pflanzen war ein Fensterbrett vor einem nach Südosten gehenden Fenster, das bis mittags 1 bis 2 Uhr direkte Sonne hatte.

Jeden Tag fand eine genaue Besichtigung der Pflanzen statt, ob nicht etwa der Kohlweißling oder ein anderer Schädling sich eingefunden hatte. Eventuell wurde die Entfernung desselben schleunigst vorgenommen.

Die Nährlösung, mit der die Erde täglich begossen wurde, hatte folgende Zusammensetzung;

Nährlösung beim CH_3OH-Wirsingversuch:		Nährlösung beim Kontrollversuch hierzu:	
Methylalkohol . . .	0,20 %	Monokaliphosphat . .	0,03 %
Monokaliphosphat . .	0,03 %	Calciumnitrat	0,05 %
Calciumnitrat	0,05 %	Magnesiumsulfat . .	0,02 %
Magnesiumsulfat . . .	0,02 %	Eisensalz	Spur.
Eisensalz	Spur		

Der Methylalkohol wurde in relativ starker Konzentration gegeben, weil ich schon früher gefunden hatte, daß er in dieser Stärke ertragen wird, und so eher ein Erfolg zu erwarten war als bei größeren Verdünnungen.

Der Versuch begann am 15. März und endete am 11. Juni Versuchsdauer also 3 Monate.

Die Licht- und Wärmeverhältnisse waren sehr günstig.

Befund bei der Untersuchung der Methylalkohol-Wirsingpflanze am 11. Juni:

Höhe der Pflanze vom Boden an 30 cm.

Länge des längsten Blattes 20 cm.

Breite des größten Blattes 20 cm.

Stengel an seiner dicksten Stelle $2^1/_2$ cm dick.

Die vier ältesten Blätter wiesen noch keine deutliche Kräuselung auf; die folgenden haben bereits zahlreiche tiefe Gruben an der Blattunterseite und Erhebungen an der Oberseite.

An den weiteren 8 Blättern nahm die Kräuselung beständig zu; das jüngste sichtbare Blatt war in dichte Falten gelegt.

Farbe der Blätter bereift grün.

Stengel 10 cm lang bis zum ersten Blatt (ein paar welke Blätter waren allerdings abgefallen).

Die Pflanze machte von allen weitaus den kräftigsten Eindruck, namentlich war sie der gleichzeitig mit ihr aufgestellt gewesenen, unter ganz gleichen Bedingungen gezogenen Kontrollpflanze weit überlegen, weniger aber doch recht deutlich den Methylal- und den Glycerinpflanzen.

Gesamtgewicht der von der anhängenden Erde befreiten Pflanze	164,5 g
Gewicht der Wurzel	9,8 „
Gewicht des Stengels	22,5 „
Gewicht der Blätter	132,2 „

Die Wurzel machte 5,95 $^0/_0$ des Gesamtgewichtes, der Stengel 13,67 $^0/_0$, die Blätter 80,38 $^0/_0$ aus.

Die mikroskopische Untersuchung eines Blattstückchens ergab die gewöhnliche Struktur des Kohlblattes. Die Blätter wiesen aber, entsprechend der üppigen, auch in die Dicke gehenden Entwicklung, eine große Zahl von assimilierenden Schichten (Pallisaden- und Blattfleischzellen) auf, 8 bis 10 Schichten.

Mit Coffeinlösung konnte keine Reaktion erhalten werden, ein Zeichen, daß das Albumin im Zellsafte nicht in Form von aktivem Albumin enthalten war.

Um die Menge des mit Kaliwasser (1 : 1000) extrahierbaren Proteins zu ermitteln, wurden die Blätter, Stengel und Wurzeln,

jedes für sich, gut zerkleinert und mit einer überschüssigen Menge von Kaliwasser 3 Tage lang extrahiert.

Hierauf wurde filtriert.

Das Filtrat wurde bis zum Kochen erhitzt und mit Essigsäure schwach angesäuert.

Es entstand ein weißlicher Niederschlag, der sich zu Flocken sammelte und bald größtenteils obenauf schwamm (wie Suppenschaum).

Dieser Niederschlag wurde auf einem Filter gesammelt und nach dem Auswaschen getrocknet.

Das getrocknete Eiweiß betrug 0,51 g bei den Blättern

Das Frischgewicht der Blätter hatte 132,2 g betragen.

Demnach haben wir 0,39 % trocknes Eiweiß in den Blättern der Methylalkohol-Wirsingpflanze.

Im Stengel und in der Wurzel wurde der Eiweißgehalt in gleicher Weise zu bestimmen versucht.

Es ergaben sich geringere Beträge.

Der Eiweißgehalt der Wurzel war überhaupt nicht zu bestimmen.

Denn die Neutralisation des Kaliwasserextraktes ergab hier nur eine schwache Trübung.

Beim Stengel gelang es, die Menge ungefähr festzustellen.

Es war 0,03 bis 0,04 g trocknes Eiweiß pro 22,5 g Stengel.

Das macht 0,18 % Eiweiß.

Es scheint demnach, daß die Wurzel fast kein Eiweiß ablagert, wenigstens solange sie im lebhaften Wachstum begriffen ist. Die Pflanze war ja erst $3^1/_2$ Monate alt.

Im Stengel wird etwas Eiweiß zur Ablagerung gebracht, aber wesentlich weniger als wie in den Blättern.

Es mag das beim Stengel vielleicht zum Teil darauf zurückgeführt werden, daß ein beträchtlicher Teil der Zellen in leblose Holzzellen übergeht, die nicht imstande sind, Eiweiß zu speichern.

In der Wurzelentwicklung machte sich eine auffallende Vernachlässigung geltend, die in grellem Widerspruch zu der sonst so kräftig angelegten Pflanze zu stehen schien.

Erklärlich wird das aber durch die offenbar sehr ausgiebige organische Ernährung der Pflanzen bei diesem Versuch (siehe die Ausführungen bei Beschreibung der Kontrollpflanze).

Binnen 3 Monaten hatte sich das Frischgewicht der Pflanze von 2 g auf 164,5 g vermehrt, also auf das 82 fache.

Was ist davon auf das Konto der Methylalkoholernährung zu setzen?

Neben derselben hatte natürlich eine Kohlensäureernährung stattgefunden.

Sehen wir zur Kontrollpflanze (weiter unten).

Sie hatte unter ganz gleichen Verhältnissen von 2 bis 74,5 g zugenommen.

Es bleibt also ein Unterschied von 90 g.

Diese Differenz kann wohl zum großen Teil auf den Methylalkohol geschoben werden.

Denn wenn auch zugegeben werden mag, daß einiger Unterschied schon in der ursprünglichen Anlage zur Entwicklung gegeben sei, so macht das doch keinenfalls einen so großen Betrag aus, da die Kontrollpflanze während der ganzen Entwicklung sich durchaus normal zeigte.

Es wurde täglich $^1/_2$ l der obengenannten Nährlösung zugeführt, außer wenn nasses Wetter war.

Ich schätze die gesamte Lösung auf 25 l; das macht 50 g Methylalkohol. Unter Hinzuziehung des Salpeterstickstoffes und des Phosphors zur Eiweißbildung mag das wohl jenes Plus von 90 g erklären.

Befund bei der Untersuchunng der Kontrollpflanze zum Methylalkohol-Wirsingversuch (lediglich mit mineralischer Nährlösung begossen) am 11. Juni (nach 3 Monaten):

Höhe der Pflanze vom Boden an 30 cm.

Länge des längsten Blattes 16 cm.

Breite des größten Blattes 10 cm.

Stengel an seiner dicksten Stelle (oben) 1 cm dick.

Die 5 ältesten Blätter weisen noch keine deutliche Kräuselung auf. Die folgenden 6 zeigten eine sehr mäßige Krausung; das sechste, jüngste Blatt (eigentlich das elfte im ganzen) wies noch recht mäßige Kräuselung auf.

Stengel 16 cm lang bis zum ersten Blattansatz (ein paar welke Blätter waren allerdings abgefallen).

Die Gewichtsbestimmung der einzelnen Teile ergab folgendes (alles in Frischgewicht angegeben, bei den Wurzeln natürlich unter sorgfältiger Entfernung der Erde):

Gesamtgewicht der Pflanze . .	74,5 g
Gewicht der Wurzel	13,5 g
Gewicht des Stengels	8,0 g
Gewicht der Blätter	53,0 g

Es fällt sofort auf, daß das Gesamtgewicht der Pflanze viel geringer ist als bei der Methylalkoholpflanze, ferner daß das Wurzelgewicht verhältnismäßig groß ist.

Schon beim Herausnehmen der Pflanze aus der Erde fiel es mir auf, daß die Wurzel weitaus größer war wie bei der sonst doch viel kräftiger entwickelten Methylalkoholpflanze, die unter ganz gleichen Verhältnissen unmittelbar neben der Kontrollpflanze gezogen worden war und auch von Anfang dieselbe Größe und dieselben Proportionen aufwies.

Es drängt sich unwillkürlich der Gedanke auf, daß die ausgezeichnete Ernährung durch den Methylalkohol, der reichlich zu Gebote stand, die Methylalkoholpflanze von der Ausbildung eines kräftigeren Wurzelsystems Abstand nehmen ließ.

Das setzt freilich voraus, daß die Wurzel außer nach Mineralnahrung auch nach organischer Nahrung im Boden sozusagen sucht, was übrigens gar nicht unwahrscheinlich ist.

Denn die organische Nahrung wird von zahlreichen grünen Pflanzen nachgewiesenermaßen ausgiebig verwertet. Der Gemüsekohl gehört auch dazu.

Der Eiweißgehalt der Blätter wurde in ganz gleicher Weise bestimmt wie beim Methylalkoholversuch.

Es ergab sich 0,18 g trockenes Eiweiß auf 53 g Blätter.

Das macht 0,34 % Eiweiß in den Blättern.

Bei der Methylalkoholpflanze hatten wir 0,39 % Eiweiß.

Also ist dieselbe auch in bezug auf Eiweißgehalt der Blätter der Kontrollpflanze etwas überlegen.

Beides 0,39 % gerinnbares Eiweiß in den Blättern der Methylalkohol-Wirsingpflanze und 0,34 % extrahierbares in den Blättern der Kontrollpflanze ist freilich nicht viel im Vergleich zu den Eiweißzahlen oder Stickstoffsubstanzzahlen, die man in der Literatur angegeben findet.

Es ist in letzterer von 2 bis 3 % Eiweiß bzw. Stickstoffsubstanz die Rede.

Zu der Stickstoffsubstanz gehören allerdings auch die Amide, wie Asparagin, Tyrosin, Leucin usw. Diese wurden bei meiner

Methode selbstverständlich nicht mitgerechnet, da sie nicht gerinnbar sind.

Außerdem ist ja sehr wohl möglich, daß die Eiweißextraktion mit Kaliwasser recht unvollkommen war.

Denn es gelingt beim Zerwiegen von Blättern doch keinenfalls, alle Zellen des Blattes zu öffnen, und durch die Zellhaut gehen Lösungen von genuinen Eiweißstoffen nicht gut durch.

Wir werden also damit rechnen müssen, daß ein ansehnlicher Teil, vielleicht der größere Teil, in den gewiegten Blättern stecken blieb.

Da aber beide Pflanzen vollkommen gleich behandelt wurden zur Gewinnung des Eiweißes, so sind die erhaltenen Zahlen doch von einigem Werte, nämlich vergleichbar, weil nach der gleichen Methode erhalten.

Ja, man darf wohl annehmen, daß ein Teil des Methylalkohols in der Pflanze zur Verbrennung gelangt, ein anderer vielleicht durch die Bodenbakterien in Beschlag genommen wurde.

Der völlige Verbrauch zum Ansatz neuer Pflanzensubstanz ist dadurch ausgeschlossen, daß 90 g Pflanzensubstanz nur ca. 9 g, d. i. 10°/$_0$ Trockensubstanz bedeuten.

Nach den mir vorliegenden Analysen enthalten die verschiedenen Kohlarten folgende Mengen Wasser und organische Substanz:

	Wasser	Stickstoffsubstanz	Zucker u. N-freie Extraktstoffe	Holzfaser	Fett
Blumenkohl . . .	90,89	2,48	4,54	0,91	9,14
Winterkohl (krauser Grünkohl) . . .	80,03	3,99	11,63	1,88	0,90
Rotkraut	92,60	1,80	3,79	0,97	0,20
Weißkraut . . .	89,97	1,89	4,87	1,84	0,20

Gegen die Hälfte der Stickstoffsubstanz ist als Proteinsubstanz zu rechnen, das andere als Aminokörper.

Daß Methylalkohol in den Kohlpflanzen zur Verbrennung gelangen könne, ist wahrscheinlich; doch liegen keine Angaben über Verbrennung von Methylalkohol oder anderen Alkoholen im Körper der grünen Pflanzen vor.

Im tierischen bzw. menschlichen Körper wird bekanntlich Äthylalkohol sehr leicht zur Verbrennung gebracht.

Der Methylalkohol aber verbrennt schwer, bleibt also

großenteils als solcher im Körper, da er ja auch nicht assimiliert wird, und ruft Vergiftungserscheinungen hervor.

Solche sind nun bei meinen Kohlpflanzen in keiner Weise hervorgetreten.

Also kann angenommen werden, daß der nicht assimilierte Überschuß zur Verbrennung gelangte.

Was die Verwendung des Methylalkokols durch Mikroorganismen des Bodens anlangt, so konnte ich feststellen, daß er manchmal eine recht gute Kohlenstoffquelle ist, während die nahestehende Ameisensäure sowie der Formaldehyd unbrauchbar zu sein scheinen (erstere selten brauchbar).

Für Bierhefe freilich ist Methylalkohol, soweit die bisherigen Untersuchungen reichen, nicht verwendbar.

Manche Bakterienarten wachsen in Methylalkohollösungen neben kleinen Hefearten.

Ich stellte mir (Bakt. C.-B. 29. Bd.) Methylalkohollösungen von 0,0025 $^0/_0$ bis zu 10 $^0/_0$ her und versah dieselben mit den nötigen Mineralstoffen, Stickstoffquellen unorganischer Natur.

Nur bei 10 $^0/_0$ wuchs kein Pilz.

Bei 5 $^0/_0$ kam, freilich sehr allmählich, Pilzvegetation hervor.

Bei 2 $^0/_0$ und abwärts rascher.

Demnach ist Methylalkohol für diese Mikroorganismen soviel wie ungiftig und dient denselben schon von 5 $^0/_0$ an zur C-Nahrung.

Daß der Methylalkohol Schimmelpilzen zur Nahrung dienen könne, ist bisher nicht nachgewiesen worden.

Hingegen habe ich bei manchen Algen (Spirogyren, Gygnemen usw.) nachweisen können, daß dieselben durch Methylalkohol ernährt werden.

Versuche bei Lichtausschluß haben zunächst negatives Resultat ergeben.

Als dann dem Lichte Zutritt gewährt und dabei die Kohlensäure ausgeschlossen wurde, konnte festgestellt werden, daß der Methylalkohol in der Verdünnung 0,1 $^0/_0$ assimiliert und in Stärke verwandelt werde (B. in Habilitationsschrift, Erlangen 1888).

Wir treffen also in den untersten Abteilungen der Chlorophyllpflanzen ebenso wie bei den niedersten Pilzen die Fähigkeit an, Methylalkohol zur Ernährung zu verwenden.

Die Verwendung des Methylalkohols zur Ernährung gibt zu denken.

Unverändert kann sein Molekül natürlich nicht zum Stärke- oder Eiweißaufbau dienen; es hat zu viel Wasserstoff.

In beiden Fällen kann wohl nur eine Oxydation bis zu CH_2O angenommen werden, welcher Stoff dann unmittelbar in Kohlehydrat übergeht:

$$6\,CH_2O = C_6H_{12}O_6.$$

Bei Verwendung zur Eiweißbildung gilt die Loewsche Formel, die den Zutritt von Ammoniak, dann H_2S und H_2 fordert (L. u. B., Chem. Kraftquelle, theoret. Teil, S. 6):

$$4\,HCOH + H_3N = \begin{matrix} H_2N.CH.COH \\ | \\ CH_2.COH \end{matrix} + 2\,H_2O$$

dann $$3\left\{\begin{matrix} H_2N.CH.COH \\ | \\ CH_2.COH \end{matrix}\right\} = C_{12}H_{17}N_3O_4 + 2\,H_2O,$$ ferner

$$6\,C_{12}H_{17}N_3O_4 + H_2S + 6\,H_2 = \underbrace{C_{72}H_{112}N_{18}SO_{22}}_{\text{Einfachster Ausdruck für Eiweiß}} + 2\,H_2O.$$

Das Gemeinsame an beiden Vorgängen ist die Oxydation des Methylalkohols zu CH_2O.

Sie muß angenommen werden; sonst ist die Verwendung nicht denkbar.

Der experimentelle Beweis dafür ist nicht erbracht.

Er wird auch kaum zu erbringen sein, ebensowenig als der einer intermediären CH_2O-Bildung bei der Kohlensäureassimilation.

Im übrigen gehört die Oxydation von $CH_3.OH$ zu CH_2O durchaus nicht zu den einer Zelle unmöglichen Leistungen.

Werden doch die Moleküle des Äthylalkohols im Körper höherer Tiere zu Kohlensäure und Wasser verbrannt.

Insbesondere dürfte das bei Pilzen, namentlich Bakterien, nicht wundernehmen, die ja größere chemische Leistungen, Oxydationen und Reduktionen, auch sonst zu vollbringen vermögen.

Nur wenn die Schwierigkeiten der CH_2O-Bildung allzu groß sind, unterbleibt die Oxydation. $CH_3.OH$ bietet in dieser Hinsicht keine großen Schwierigkeiten.

Auch Äthylenglykol $\begin{matrix} H_2C-OH \\ | \\ H_2C-OH \end{matrix}$ ist noch Nährstoff für niedere Organismen, dagegen nicht mehr das Pinakon, das als Tetramethylglykol aufzufassen ist: $\begin{matrix} (CH_3)_2C-OH \\ | \\ (CH_3)_2C-OH \end{matrix}$.

Nach O. Loew (Beitrag zur Kenntnis der chemischen Fähigkeiten von Bakterien, Centralbl. f. Bakt. **12**, 1892, Nr. 11/12) bringen 0,5 % ige Lösungen von Pinakon (+ 0,05 PO_4K_2H + 0,05 $PO_4(NH_4)_2H$ + 0,01 $MgSO_4$) keine Bakterienvegetation hervor[1]), während bei Äthylenglykol bald Bakterientrübung eintrat.

Offenbar ist das Pinakon (Tetramethylglykol) innerhalb der Zellen nicht in CHOH überzuführen.

Araucaria und Methylalkohol.

Zwei ganz gleich aussehende gleichgroße Araucaria-Topfpflanzen von 3 cm Höhe, die in großen Töpfen sich befanden, wurden zu dem Versuch ausgewählt im Sommer 1912 (Juni).

Sie wurden während der Wachstumsperiode regelmäßig mit Nährlösung begossen, aber nur so viel, daß keine zu starke Trockenheit eintrat.

Die Nährlösungen waren:

a)	Methylalkohol . . .	1,0 %	b) Calciumnitrat . . .	0,4 %
	Calciumnitrat . . .	0,4 %	Magnesiumsulfat . .	0,1 %
	Magnesiumsulfat . .	0,1 %	Monokaliphosphat .	0,4 %
	Monokaliphosphat .	0,4 %	Eisen	Spur
	Eisen	Spur		

Die Pflanze a) sei Methylalkoholpflanze, die Pflanze b) Kontrollpflanze genannt.

Beide befanden sich völlig in normalem, gesundem Zustande, als sie in Behandlung genommen wurden.

Die Methylalkoholpflanze blieb schon im ersten Jahre im Wachstum etwas zurück.

Während der Hauptstamm der Kontrollpflanze 10 cm lang wurde, erreichte der Hauptstamm der Methylalkoholpflanze nur 6 cm.

Die am Gipfel angelegten Wirtelzweige waren bei der Kontrollpflanze nur 4, bei der Methylalkoholpflanze 6.

Im zweiten Versuchsjahre wurde nur selten mit Methylalkohol begossen, da mir ein schädlicher Einfluß konstatiert schien.

Das geringe Wachstum und die ungewöhnlich starke Verzweigung waren deutliche Anzeichen einer Schädigung.

Nun wuchs der Kontrollpflanzenhauptstamm um 7 cm, der der Methylalkoholpflanze um 5 cm.

Die Verzweigung am Gipfel ergab bei letzterer Pflanze wieder 6 Wirtelzweige, bei ersterer 5.

---

[1]) Trotz Infektion mit Fäulnispilzen.

Die Schädigung war also noch da.

Die Seitenzweige des ersten Jahres waren nun bei der Kontrollpflanze ebenfalls weit länger geworden als die der anderen Pflanze. Sie maßen bis 25 cm Länge mit 10 cm langen Fiederzweigen. Die erstjährigen Seitenzweige der Methylalkoholpflanze waren bis 15 cm lang und hatten Fiederzweige von nur 5 cm Länge.

Und so ging es weiter. Auch im dritten Jahre zeigte der Methylalkoholbaum ein deutliches Zurückbleiben, obwohl nun fast gar nicht mehr mit Methylalkohol begossen wurde.

Auch die Blätter der Methylalkoholpflanze waren viel kürzer. Sie erreichten eine Länge bis zu 0,6 cm, die der Kontrollpflanze bis zu 1,2 cm.

Alle Teile der Methylalkoholpflanze schienen mir starrer zu sein als die der andern.

Eine mikroskopische Untersuchung ergab allerdings keine prägnanten Unterschiede in der anatomischen Struktur.

Jedenfalls ist festzuhalten, daß eine 1 $^0/_0$ige Methylalkohollösung das Wachstum der Araucaria ungünstig verändert.

Es tritt eine Verzögerung des Wachstums, ein Kleinbleiben ein und, wie mir scheint, eine gedrängtere Gestalt.

Man darf aber aus diesem einen Versuch mit Araucaria nicht schließen, daß der Methylalkohol für dieselbe überhaupt schädlich sei.

Denn die Konzentration 1 $^0/_0$ ist tatsächlich relativ so groß, daß man an eine Schädigung wohl gerne glauben mag. Es muß ja wundernehmen, daß die Pflanze so lange ausgehalten hat.

Mit 0,5 oder 0,2 $^0/_0$ Methylalkohol wäre vielleicht gar keine schädliche Wirkung zustande gekommen. Leider hatte ich nicht mehr Pflanzen als zwei.

Versuche mit Bohnen brachten eine weitere Bestätigung der Nährfähigkeit des Methylalkohols.

Bohnen und Methylalkohol.

Keimlinge von Feuerbohne (Phaseolus multiflorus) wurden mit Methylalkohol in verschiedener Konzentration genährt (neben 0,1 $^0/_0$ Nährsalz).

Sie wurden als Wasserkulturen aufgezogen.

Während beim Kontrollversuch mit mineralischen Nährsalzen allein binnen 14 Tagen ein nur 2 cm langer und 3 mm

dicker Stengel heranwuchs, hatte derselbe bei 0,5 % Methylalkohol eine Länge von 5 cm und Stärke von 5 mm; bei 1 % Methylalkohol eine Länge von 4 cm und Stärke von 5 mm; bei 2 % Methylalkohol eine Länge von 6 cm und Stärke von 4 mm.

Die Blattentwicklung war bei 2 % am günstigsten.

Von den zwei sichtbaren Blättern war eines, das ältere, 2 cm lang und dunkelgrün, das andere nur ein wenig kleiner.

Bei 1 % Methylalkohol waren die beiden sichtbaren Blätter erst 1 cm lang und hellgrün.

Am Kontrollversuch waren sie noch etwas kleiner und nur gelblichgrün.

Auch die Wurzelentwicklung zeigte sich bei 2 % Methylalkohol am stärksten; die Hauptwurzel war 2½ mm stark an der dicksten Stelle und 5 cm lang, dicht hintereinander mit Seitenwurzeln von 0,2 bis 3 cm Länge besetzt, etwa 20 im ganzen, so daß die Gesamtwurzellänge ca. 50 cm betrug.

Bei 1 % CH_3OH war das Wurzelsystem ähnlich, nur etwas schwächer.

Beim Kontrollversuch war die Hauptwurzel (durch irgendeinen Zufall) verkümmert, kaum 1 cm lang, die Seitenwurzeln waren höchstens ½ bis 1 mm dick und hatten zusammen eine Gesamtlänge von 20 cm.

Nach weiteren 14 Tagen zeigte der Stengel der Pflanze mit 0,5 % Methylalkohol eine Länge von 20 cm und Dicke von 6 mm an der stärksten Stelle.

Die Blätter waren gut entwickelt und hatten eine Länge von 3 cm, zeigten dunkelgrüne Farbe.

Das Wurzelsystem war in dieser 0,5 %igen CH_3OH-Lösung ebenfalls gut gediehen.

Die Hauptwurzel war 10 cm lang und sehr kräftig; mehrere fast ebenso lange Seitenwurzeln waren da, an diesen wieder weitere Auszweigungen.

Die übrigen Pflanzen dieser Versuchsreihe waren nicht weiter stehen gelassen worden, bis auf den Kontrollversuch, der an Entwicklung weit hinter den Methylalkoholversuchen zurückblieb.

Daß somit der Methylalkohol die Feuerbohne bei 2 % oder 1 % oder 0,5 % zu ernähren vermag, unterliegt wohl keinem Zweifel.

Noch größere Verdünnungen des Methylalkohols wurden nicht probiert, weil wohl kein erheblicherer Ausschlag zu erwarten stand.

Ein Versuch wurde dann auch noch mit der Sojabohne angestellt.

Zunächst wurden mehrere Sojabohnenkeimlinge in der Keimschale aus Samen gezogen.

Daraus waren einige gleiche und normal gewachsene Keimlinge ausgewählt und als Wasserkulturen weitergezogen.

Einer derselben wurde in Lösung: Methylalkohol 0,5 % + Mineralsalz 0,1 % verbracht und darin dauernd (später unter Erneuerung) belassen.

Nach 8 Wochen war der hypokotyle Stengel des Keimlings kräftig entwickelt, 8 cm lang; die Wurzel war stark verzweigt, aber kurz und etwas verpilzt.

Nach weiteren 14 Tagen war das hypokotyle Stengelglied 10 cm lang, der obere Stengel (über den Keimblättern) 2½ cm. An der Spitze desselben waren junge Blätter zu sehen. Das Wurzelsystem war etwas kurz, aber doch deutlich weiterentwickelt.

Gurkenkeimling und Methylalkohol:

In einer Lösung von 0,5 % Methylalkohol + 0,1 % Mineralsalz war nach 2 Wochen der Keimling noch am Leben, aber nicht gewachsen; nach 3 Wochen war er abgestorben. 0,5 % ist also hier schädlich.

Möhrenkeimling und Methylalkohol:

Keimlinge, die 3 Wochen lang in 0,5 % $CH_3 . OH$ + 0,1 % Mineralsalzlösung verweilt hatten, zeigten dann eine verpilzte Wurzel; der Stengel war aber noch gesund, freilich nicht so lang und so kräftig wie bei einem gleichzeitig aufgestellten gleichgehaltenen Kontrollversuch; auch die Blattbildung war bei der Kontrollpflanze etwas weiter vorgeschritten.

Kopfsalat und Methylalkohol:

Versuch ebenso angestellt wie vorhin.

Nach 3 Wochen war der eine der eingesetzten Keimlinge völlig abgestorben, der andere noch lebend, aber mit kümmerlicher Entwicklung von Wurzel und Stengel; Wurzel verpilzt.

Fichtenkeimlinge und Methyalkohol:

Versuchsanstellung wie vorhin.

Nach 6 Tagen zeigte sich der Keimling in kräftiger Entwicklung, die Wurzel war 2 cm lang, der hypokotyle Stengel

1 cm, die Kotyledonen waren fast völlig aus der Samenschale herausgeschlüpft.

Bei einem Kontrollversuch (mit Mineralsalz, aber ohne Methylalkohol) waren die Keimblätter noch ganz in der Samenschale enthalten, der Keimling (hypokotyler Stengel und Wurzel zusammen) kaum 1 cm lang.

Nach weiteren 14 Tagen war bei der (stark weitergewachsenen) Methylalkoholpflanze der hypokotyle Stengel mit der Gipfelknospe (den Keimblättern) $2^1/_2$ cm lang, die Wurzel 3 cm; beim Kontrollversuch Stengel 1,2 cm lang, die Wurzel $1^1/_2$ cm.

Fichtenkeimlinge vertragen also 0,5 % CH_3OH nicht bloß, sondern ziehen daraus Vorteil.

Im großen und ganzen geht wohl aus den bereits beschriebenen und noch folgenden Versuchen hervor, daß 0,2 % Methylalkohol eine meistens passende unschädliche Konzentration für Ernährungsversuche mit Methylalkohol ist.

0,5 % ist oft schon zu stark.

Ausnahmsweise wird aber noch 1 % und sogar 2 % ertragen und wirkt ernährend.

Roggen und Methylalkohol.

Junge Roggenpflanzen, die in den Topf gesät waren, wurden zum Versuche herangezogen.

Sie wurden, so oft es anging, mit Nährlösung begossen und zur geeigneten Zeit vor einem Südostfenster untergebracht.

Der Versuch begann am 13. März und endigte am 23. Juni.

Nährlösung für die Kontrollpflanze		Nährlösung für die Methylalkoholpflanze	
Calciumnitrat . .	0,4 %	Methylalkohol .	0,2 %
Monokaliphosphat .	0,4 %	Monokaliphosphat .	0,4 %
Magnesiumsulfat .	0,1 %	Calciumnitrat . .	0,4 %
Eisen	Spur	Magnesiumsulfat .	0,1 %
		Eisen	Spur

Mit diesen Lösungen wurden die Töpfe nach Bedarf gegossen, gerade so wie sonst mit gestandenem Wasser begossen wird. Der aufgegosseneMethylalkohol mag im ganzen etwa 20 g betragen haben.

Die Untersuchung der Pflanzen am 23. Juni ergab:

Kontrollpflanze		Methylalkoholpflanze	
Stengel und Blätter	11,2 g	Stengel und Blätter	14,5 g
Wurzel	4,6 g	Wurzel	9,5 g
Gesamtgewicht . .	15,8 g	Gesamtgewicht . .	24,0 g

Somit haben wir auch hier eine vorteilhafte Wirkung des Methylalkohols zu konstatieren.

Wie aus dem Gewicht ersichtlich, war die Wurzel der Methylalkoholpflanze verhältnismäßig viel stärker entwickelt als die der Kontrollpflanze.

Auch schon beim Herausnehmen der Pflanzen aus dem Topf fiel mir dies auf.

Es ist auch nicht wahrscheinlich, daß der Unterschied auf einer individuellen oder sonstigen Zufälligkeit beruht.

Wie ich schon öfter bemerkte, zeigt sich der Erfolg einer guten Ernährung bei Getreidepflanzen zunächst meistens in der starken Wurzelentwicklung.

So dürfte auch hier der Überschuß von Nahrung, richtiger des daraus entstandenen Pflanzenbaustoffes, zunächst zur Vergrößerung der Wurzel verwendet worden sein.

Ein Teil der Wurzel des Methylalkoholversuches hatte sich wie ein Netz um die Oberfläche des Topfballens gewunden und war so dicht und fein verzweigt, daß ich beim Herausnehmen des Ballens zunächst glaubte, es sei durch Versehen ein Stück Watte oder Papier zwischen Wandung und Erde gelangt.

Vielleicht hat zum Teil auch das größere Luftbedürfnis der Methylalkoholpflanze zur stärkeren Wurzelentwicklung, bis die Ballenoberfläche und damit der poröse Scherben sowie das Loch im Boden des Scherbens erreicht war, geführt.

Denn es ist ja wohl zweifellos anzunehmen, daß eine Verwendung des Methylalkohols zur Ernährung Sauerstoffverbrauch bedeutet.

Betrachten wir uns die Formeln der zunächst in Betracht kommenden Substanzen:

Methylalkohol . . . . . $CH_3.OH$ oder CH_4O
Zucker . . . . $C_6H_{12}O_6$
Cellulose (oder Stärke) . $C_6H_{10}O_5$

Damit aus Methylalkohol Zucker und Cellulose oder Stärke oder ein anderes Kohlenhydrat wird, muß ein Teil des Wasserstoffes aus dem Molekül CH_3OH entfernt werden, nämlich 2 Wasserstoffatome pro 1 Kohlenstoffatom.

Das geschieht auf dem Wege der Oxydation.

Auch wenn der Methyalkohol teilweise innerhalb der Zellen zur Verbrennung gelangt, muß Sauerstoff her, sonst gelingt ja die Verbrennung nicht.

Künstliche Glycerinernährung.

Versuche mit Brassica oleracea (Var. Wirsing) und Glycerin.

Die Versuche wurden ganz ähnlich angestellt wie beim Methylalkohol.

Die zum Begießen verwendeten Lösungen waren folgende:

Kontrollpflanze		Glycerinpflanze	
Calciumnitrat . .	0,40 %	Glycerin . . .	0,25 %
Monokaliphosphat	0,40 %	Calciumnitrat . .	0,40 %
Magnesiumsulfat .	0,15 %	Monokaliphosphat	0,40 %
Eisen	Spur	Magnesiumsulfat .	0,15 %
		Eisen	Spur

Damit wurde 3 Monate lang gegossen.

In der glycerinhaltigen Nährlösung, d. h. in den in der Spritzflasche zurückbleibenden Resten derselben zeigten sich immer bald Pilzhäute. Also muß man auch mit dem Auftreten von Glycerin verzehrenden Pilzen im Boden rechnen.

Das Glycerin wird zum Teil schon im Boden in Beschlag genommen werden, bevor es in die Pflanze eindringt.

Wir können also nicht mit dem Verbrauch des ganzen zugeführten Glycerins zur Kohlernährung rechnen.

Das ist auch nicht nötig.

Die zugeführte Menge Glycerin war überschüssig. Sie betrug binnen 3 Monaten bei einer einzigen Kohlpflanze ca. 50 g.

Da das Glycerin für die meisten Mikroorganismen, namentlich auch für Bakterien, eine vortreffliche C-Nahrung ist, so darf man wohl annehmen, daß viel von diesem Stoff schon durch die Bodenorganismen verbraucht wurde.

Der in die Wirsingpflanze selbst eingedrungene Teil mag dort zum Teil zur Ernährung gedient haben, zum Teil der Verbrennung anheimgefallen sein.

Befund der Glycerin-Wirsingpflanze am 11. Juni:

Höhe der Pflanze 30 cm.

Höhe des Stengels bis zum ersten grünen Blatt (einige Blätter waren vergilbt und abgefallen) 8 cm.

Größte Dicke des Stengels (oben) $1^3/_4$ cm.

Größtes Blatt 22 cm lang, an der breitesten Stelle der Spreiten 14 cm breit.

Zahl der grünen Blätter — mit dem jüngsten eben noch sichtbaren — 15.

Die äußeren 8 Blätter ziemlich glatt.

Dann allmählich zunehmende Kräuselung.

Das innerste ziemlich stark gekräuselt, aber nicht so wie bei der Methylalpflanze und noch weit weniger als bei der Methylalkoholpflanze.

Blätter mit einem abwischbaren Reif.

Schon der oberflächliche Vergleich mit der Kontrollpflanze ergab, daß letztere bei weitem nicht so gut entwickelt war.

Insbesondere machten die Blätter einen weit besseren Eindruck. Sie waren fleischiger.

Um Genaueres zu erfahren, hob ich die Pflanze sorgfältig mit einem großen Erdballen aus, wusch die Erde nach längerem Aufweichen weg und zerlegte die Pflanze in Wurzel, Stamm und Blatt.

Es ergab sich nach dem Abtrocknen mit Filtrierpapier folgendes Resultat:

Frischgewicht der ganzen Pflanze . .	**138,1** g.
Blattgewicht	106,5 g,
Stengelgewicht	21,1 g,
Wurzelgewicht	10,5 g.

Die Wurzel machte 7,6 % des ganzen, der Stengel 15,3 %, die Blätter 77,1 % des Gesamtgewichtes aus.

Die Kontrollpflanze wog nach dem Versuch 74,4 g (siehe nachher).

Also war ein Unterschied von 138,1 — 74,4 = 63,7 g zugunsten der Glycerinpflanze zu konstatieren.

Befund der Kontrollpflanze (Anfangsgewicht ca. 2 g) nach 3 Monaten:

Sie wurde mit ausschließlich mineralischer Nährlösung begossen:

Calciumnitrat . . .	0,40 %,
Monokaliphosphat . .	0,40 %,
Magnesiumsulfat . .	0,15 %,
Eisen	Spur.

Nach 3 Monaten zeigte sich ein augenfälliger Unterschied gegenüber der Glycerinpflanze.

Die Kontrollpflanze war in allen Teilen viel weniger entwickelt.

Die Gewichtsbestimmung ergab:

Gesamtgewicht der Pflanze . .	74,4 g.
Gewicht der Wurzel	13,6 g,

Gewicht des Stengels . . . . 7,9 g,
Gewicht der Blätter . . . . . 52,9 g.

Das Gesamtgewicht war also um 63,7 g geringer als bei der Glycerinpflanze. Letztere war nahezu doppelt so schwer.

Der ernährende Einfluß des Glycerins ist ersichtlich.

Daß grüne Pflanzen mit Glycerin ernährt werden können, ist nicht mehr neu, wenn auch bei den meisten Untersuchungen hierüber die Gewichtsangaben fehlen.

Verfasser hat bei Spirogyren die Stärkebildung aus Glycerin im Lichte nach Kohlensäureausschluß nachgewiesen (Pfl. Arch. f. d. ges. Physiol. **125**, 475).

Quantitative Versuche mit Glycerin und Spirogyren hat Verf. im Arch. f. d. ges. Physiol. 89, 467 veröffentlicht.

Es wurde eine Lösung hergestellt, die 5 Tropfen reines Glycerin auf 250 ccm Wasser enthielt und außerdem 0,05 % Monokaliphosphat und 0,05 % Chlorkalium.

Die Lösung wurde mit 10 g Spirogyra nitida versetzt und 24 Stunden stehen gelassen.

Hierauf wurde mit Permanganat titriert, d. h. an einem kleinen Teil der Flüssigkeit der Reduktionswert festgestellt.

Die Algen gediehen sehr gut in der Lösung und häuften Stärke in den Chlorophyllbändern an.

Nach 10 Tagen wurde das Reduktionsvermögen der Nährflüssigkeit gegen Kaliumpermanganat abermals festgestellt; es hatte bedeutend abgenommen, nämlich um 66,2 %.

Die Algen hatten also ungefähr zwei Drittel des Glycerins, etwa 0,16 g (wenn 5 Tropfen Glycerin = 0,25 g gerechnet werden) binnen 10 Tagen verbraucht.

Bei einem zweiten ähnlichen Versuch ging der Gehalt an reduzierender Substanz (Glycerin) binnen 5 Tagen um 25,4 % zurück.

Ohne Algen (im Kontrollversuch) fand eine Abnahme der organischen Substanz nicht statt.

Die Rechnung ergab, daß 10 Spirogyra nitida (feucht gewogen[1]) in ersterem Falle binnen 10 Tagen 168 mg Glycerin, in letzterem binnen 5 Tagen 66,4 mg desselben verbrauchten.

Auch Trockensubstanzvermehrung konnte an den Algen festgestellt werden.

---

[1]) Etwa 1 g Tr. S. entsprechend.

Die betreffenden Versuche mögen in der zitierten Abhandlung nachgesehen werden.

Erwähnenswert dürfte noch sein, daß der Sauerstoffzutritt zur Assimilation des Glycerins durch Spirogyren nicht unbedingt nötig ist; sie setzen auch in einer Wasserstoffatmosphäre Stärke an, freilich erst nach längerer Zeit als sonst (nicht nach 6 Stunden, wohl aber nach 3 Tagen). Siehe Verf. im Arch. f. d. ges. Physiol. 125, 480, und Th. B. und Cremer[1]), Chem.-Zeitg. 1896, Nr. 101.

Methylalernährung.

Versuche mit Brassica oleracea (Var. Wirsing) und Methylal.

Von derselben Partie Wirsingpflanzen, die für die Methylalkoholversuche aus einer Gärtnerei bezogen worden waren, wurden zwei möglichst gleiche ausgesucht.

Sie hatten ein Gewicht von je 2 g und eine Länge von 10 cm.

Kräftiges Aussehen und Gesundheit der Organe waren bei beiden in gleicher Weise vorhanden.

Die Pflanzen wurden in je ein Holzkistchen gesetzt, das mit 10 kg Gartenerde gefüllt war.

Die regelmäßige Begießung, die mit Nährlösung, so oft Trockenheit der Erde eintrat, geschah, wurde, um sicherzugehen, hier wie auch in den anderen beschriebenen Fällen durch den Verfasser selbst besorgt.

Die Nährlösungen für die beiden Versuchspflanzen hatten folgende Zusammensetzung (sie wurden jedesmal frisch bereitet):

Nährlösung für den Methylalversuch		Nährlösung für den Kontrollversuch	
Methylal . . .	0,20 %	Monokaliphosphat	0,03 %
Monokaliphosphat	0,03 %	Calciumnitrat . .	0,05 %
Calciumnitrat . .	0,05 %	Magnesiumsulfat .	0,02 %
Magnesiumsulfat .	0,02 %	Eisensalz	Spur
Eisensalz	Spur		

Befund der Methylal-Wirsingpflanze am 11. Juni (nach 3 Monaten):

Höhe der Pflanze 30 cm (vom Boden an).

---

[1]) Cremer und Verf. fanden, daß in einer Wasserstoffatmosphäre von Glycerinalgen binnen 6 Stunden keine Stärke angesetzt wurde.

Höhe des Stengels $7^1/_2$ cm (bis zum ersten Blatt, ein paar Blätter waren abgefallen).

Zahl der vorhandenen grünen Blätter bis zum jüngsten oben noch sichtbaren 11.

Jüngstes Blatt sehr stark gekräuselt; desgleichen auch die drei vorhergehenden.

Das fünfte Blatt, vom jüngsten an gerechnet, war mäßig gekräuselt, die übrigen wenig, die drei untersten fast glatt.

Sämtliche Blätter mit einem abwischbaren Reif versehen.

Größtes Blatt (das fünfte von unten) 23 cm lang (inkl. Stiel), 14 cm an der breitesten Stelle der Blattspreite breit.

Stengel an der dicksten Stelle (oben) $1^1/_2$ cm dick.

Schon ein oberflächlicher Vergleich mit der gleichzeitig aufgestellten und neben der Methylalpflanze 3 Monate vor dem Südostfenster gestandenen Kontrollpflanze lehrte, daß erstere beträchtlich besser entwickelt war.

Die Gewichtsbestimmung brachte eine quantitative Bestätigung dessen. Die Pflanze wurde hierzu sorgfältig mit einem großen Erdballen herausgenommen und behutsam in Wasser von der anhängenden Erde befreit, dann das Wasser mit Filtrierpapier weggesaugt.

Frischgewicht der ganzen Pflanze . .	125,8 g.
Blattgewicht	92,5 g,
Stengelgewicht	18,1 g,
Wurzelgewicht	15,2 g.

Somit war das Gewicht der Methylalpflanze um mehr als die Hälfte größer als das der Kontrollpflanze (siehe nachher).

Die Eiweißbestimmung ergab $0{,}41\,^0/_0$ Eiweiß in den Blättern.

Im Stengel war weniger Eiweiß.

Eine unbestimmbar kleine Menge in der Wurzel.

Befund der Kontrollpflanze am 12. Juni (nach 3 Monaten):

Höhe der Pflanze vom Boden an 29 cm.

Länge des größten Blattes 15,5 cm.

Breite des größten Blattes 9,2 cm.

Stengel an seiner dicksten Stelle (oben) 0,9 cm dick.

Kräuselung war an den älteren Blättern nicht zu erkennen (es waren 6). Die jüngeren wiesen eine mäßige Kräuselung auf, sogar die jüngsten Blätter waren nicht stark gekräuselt.

Bis zum ersten (stehenden) Blatt (mehrere waren schon abgefallen) maß der Stengel 15 cm.

Die Gewichtsbestimmung von Wurzel, Stengel und Blatt ergab folgende Frischgewichte (an der Wurzel waren die Erdteilchen unter längerem Aufweichen sorgfältig entfernt worden):

Gesamtgewicht der Pflanze . .	73,8 g.
Gewicht der Wurzel	13,2 g,
Gewicht des Stengels	7,9 g,
Gewicht der Blätter	52,7 g.

Das Gesamtgewicht der Kontrollpflanze war also viel geringer als das der Methylal-Wirsingpflanze.

Das Wurzelgewicht war verhältnismäßig groß.

Wir haben also hier dieselbe Erscheinung wie bei dem Methylalkoholversuch.

Offenbar ist auch hier infolge der reichlichen organischen Ernährung mit Methylal die Wurzelentwicklung zurückgeblieben.

Die Bestimmung des Eiweißgehaltes in den Blättern ergab 0,34 g. Das macht etwas weniger als in der Methylalpflanze. Dabei war die Methode und die Zeit ganz dieselbe wie bei der Eiweißbestimmung in jener.

Überblicken wir den Befund bei dem Methylalversuch, so ist eine Ernährung des Wirsings durch Methylalzufuhr nicht zu verkennen.

Es ist gewiß nicht zufällig, daß die Methylalpflanze das Frischgewicht 125,8 g, die Kontrollpflanze nur 73,8 g besaß, also 42,0 g weniger.

Es muß also eine Verwendung zur Bildung der Pflanzensubstanz stattgefunden haben.

Die im Lauf der 3 Monate zugeführte Methylalmenge betrug freilich mehr als zur Bildung dieser 42 g Pflanzenfrischgewicht nötig war.

Die 42 g Pflanzengewicht entsprechen ca. 4 g Trockensubstanz.

Nehmen wir an, dieselbe sei lediglich Cellulose, das ist die in Pflanzen am meisten vertretene organisehe Substanz, so würden zur Bildung derselben folgende Mengen Methylal nötig sein:

$$2\,\underbrace{{}^{CH_3O}_{CH_3O}\!\!>\!CH_2}_{152} + 2\,O_2 = \underbrace{C_6H_{10}O_5}_{162} + 3\,H_2O.$$

Zu 162 Teilen Cellulose würden also 152 Teile Methylal verbraucht werden, folglich zu 4 g Cellulose 3,8 g Methylal.

Das ist etwa der zehnte Teil des Methylals, das wirklich zugeführt wurde.

Was geschah mit dem anderen Methylal?

Ich bemerkte keinen Methylalgeruch an der Topferde, als ich die Methylalpflanze nach 3 Monaten herausnahm.

Also muß das Methylal verbraucht worden sein.

In der Pflanze selbst konnte es natürlich nicht als solches stecken. Die Pflanze wäre bei solchen Methylalmengen längst abgestorben.

Im Boden konnte es vielleicht durch Mikroorganismen teilweise beschlagnahmt und verbraucht werden (zur Ernährung, zur Atmung)?

Soweit dann das Methylal noch überschüssig in die Versuchspflanze gelangte, mußte es unbedingt verbraucht worden sein.

Es bleibt keine andere Annahme übrig, als daß dieses Methylal, das nicht zur Ernährung diente, veratmet worden sei.

Wir müssen uns dazu wohl denken, daß zuerst eine Spaltung in Formaldehyd und Methylalkohol erfolgte, die beide dann zu Kohlensäure verbrannt wurden.

Erbsen und Methylal.

Junge Erbsenpflanzen in Töpfen von gleicher Größe und Kräftigkeit wurden ausgesucht und mit Nährlösung in den Töpfen weitergezogen.

Nährlösung für die Kontrollpflanze		Nährlösung für die Methylalpflanze	
Calciumnitrat . .	0,04 %	Calciumnitrat . .	0,4 %
Monokaliphosphat	0,30 %	Monokaliphosphat .	0,3 %
Magnesiumsulfat .	0,10 %	Magnesiumsulfat .	0,1 %
Eisen	Spur	Methylal	0,2 %
		Eisen	Spur

Die Begießung wurde so oft als Austrocknung der Topferde erfolgte, vorgenommen.

Beginn 13. März, Ende 24. Juni.

Als die Witterung warm genug war, wurden die Topfpflanzen vor ein Südostfenster im zweiten Stock gestellt.

Die Untersuchung der beiden Pflanzen am 24. Juni ergab:

Kontrollpflanze		Methylalpflanze	
Blätter und Stengel	10,12 g	Blätter und Stengel	8,58 g
Wurzel	1,31 g	Wurzel	0,82 g
Gesamtgewicht . .	11,43 g	Gesamtgewicht . .	9,40 g

Hier ist also ein Ausschlag im negativen Sinne eingetreten.

Die Methylalpflanze war geschädigt, sah auch danach aus.

Methylal in der Verdünnung 0,2 $^0/_0$ wirkt also schädlich auf die Erbsenpflanze ein.

Man müßte größere Verdünnungen anwenden, um zu einem positiven Ernährungserfolg zu gelangen.

An Algen hat Verf. früher in Gemeinschaft mit O. Loew Methylalernährungsversuche angestellt (Chem. physiol. Studien über Algen, Zeitschr. f. pr. Chem. **36**, 1887).

Sie fielen negativ aus. Niemals war Stärkebildung nachzuweisen.

Der Grund war darin gelegen, daß sie im Dunkeln angestellt wurden.

Ein ernährender Einfluß des Methylals (unter geringem Zusatz von Nitraten, Hexamethylenamin usw.) war freilich zu erkennen, indem die Methyalalgen besser gediehen als die Kontrollalgen.

Verf. hat später ähnliche Versuche (Habilitationsschr., Erlangen 1888, Studien und Experimente über den chemischen Vorgang der Assimilation an Algen angestellt, diesmal unter Lichtzutritt und Kohlensäureausschluß.

Sie fielen positiv aus, Stärkeansatz erfolgte.

Es scheint somit das Licht hier eine wesentliche Rolle zu spielen.

Entweder ist es zur Spaltung des Methylals in Methylalkohol und Formaldehyd nötig oder doch sehr förderlich.

Oder es findet die Stärkebildung aus diesen Stoffen ohne Lichtzutritt nicht leicht statt.

Die Versuche mit Methylal wurden vom Verf. damals angestellt, um zu beweisen, daß der Formaldehyd in Stärke übergehen kann, was wiederum eine Stütze für die bekannte Bayersche Assimilationshypothese sein sollte.

Das Methylal zerfällt verhältnismäßig leicht, z. B. bei Schwefelsäureeinwirkung sofort in Formaldehyd und Methylalkohol nach folgender Gleichung:

$$H_2C\langle{}^{OCH_3}_{OCH_3} + H_2O = H_2CO + 2CH_3.OH.$$

Die Verdünnung, in der das Methylal bei Algen ohne Schaden gebraucht werden kann, wurde durch eine besondere Versuchsreihe festgestellt.

Es zeigte sich, daß Methylal für Spirogyren in der Verdünnung 0,1 % unschädlich ist, ja dieselben fördert.

Spirogyren blieben bei 0,1 % Methylalernährung 3 Wochen lang im Dunkeln am Leben, während die Kontrollalgen abstarben.

Roggen und Methylal.

Je eine im Topf bis zu 5 cm Höhe gezogene Roggenpflanze wurde vom 16. März ab mit Nährlösung begossen.

Beide Pflanzen waren von Anfang an gleich.

Die eine davon wurde mit gewöhnlicher mineralischer Nährlösung, die andere mit methylalhaltiger Lösung begossen.

Erstere war die Kontrollpflanze, letztere die Methylalpflanze.

Nährlösung für die Kontrollpflanze		Nährlösung für die Methylalpflanze	
Calciumnitrat . .	0,04 %	Methylal . . .	0,20 %
Monokaliphosphat	0,04 %	Calciumnitrat . .	0,04 %
Magnesiumsulfat .	0,02 %	Monokaliphosphat	0,04 %
Eisen	Spur	Magnesiumsulfat .	0,02 %
		Eisen	Spur

Mit diesen Lösungen wurden die Pflanzen dauernd, jeden Tag, wenn es nötig war zu gießen, begossen; sie standen vor einem Südostfenster des zweiten Stockes in gutem Licht.

Die Lösungen wurden jedesmal eigens gemischt. Denn die fertige Lösung nimmt zu großen Raum ein.

Nach 3 Monaten waren beide Pflanzen bereits verblüht, beide in guter Entwicklung.

Die Gewichtbestimmung ergab nun:

Kontrollpflanze		Methylalpflanze	
Wurzel	2,8 g	Wurzel	3,1 g
Oberirdischer Teil	10,5 g	Oberirdischer Teil	13,5 g
Gesamtgew. . . .	13,3 g	Gesamtgew. . . .	16,6 g

Wenn auch der Unterschied zwischen beiden nicht sehr groß war, so ist ein solcher doch deutlich da, so daß man wohl von einem Nährerfolg des Methylals sprechen kann.

Jedenfalls ist auch hier wiederum nachgewiesen, daß das Methylal von grünen Pflanzen ohne Schaden ertragen wird,

was um so auffälliger ist, als dieser Stoff, der leicht in Formaldehyd und Methylalkohol zerfällt, nicht bloß für Tiere, sondern auch für Pilze giftig ist.

Ich hatte für die jedesmalige Herstellung von Begießungslösung bei den Methylal-, Methylalkohol- und Glycerin-Versuchen, ferner beim Kontrollversuch je eine eigene Spritzflasche in Benützung.

Da zeigte sich nun bald bei der Methylalkohol- wie auch bei der Glycerinflasche ein beträchtlicher Pilzbelag, während die Methylalflasche davon frei war. Die Kontrollflasche wies mehr Algen- als Pilzansatz auf.

Sommerweizen und Methylal.

Zwei Pflanzen wurden in ganz ähnlicher Weise wie vorhin als Kontroll- und Methylalpflanze gezogen.

Beide Pflanzen gediehen gut.

Nach 3 Monaten wurden die Versuchspflanzen aus dem Topf genommen, untersucht und nach sorgfältiger Abwaschung der Erde gewogen.

Kontrollpflanze		Methylalpflanze	
Wurzel	4,8 g	Wurzel	6,5 g
Oberirdische Teile	12,2 g	Oberirdische Teile	17,5 g
Gesamtgewicht	17,0 g	Gesamtgewicht	24,0 g

Auch hier ist also wiederum zu erkennen, daß das Methylal einen vorteilhaften Einfluß ausübt; das Frischgewicht der Methylalpflanze war um ein Drittel höher wie das der Kontrollpflanze.

3 Monate langes Begießen mit jener Methylallösung hatte die Pflanze nicht geschädigt, sondern gefördert.

Methylal und Pilze.

Da die Bodenbakterien bei Topfversuchen immer in Betracht kommen, so stellte ich einige Versuche über die Grenze, bei der Bakterien in Methylallösungen noch aufkommen, an. Die Lösungen wurden in bedeckten Reagensgläsern aufgestellt.

a) 1 % Pepton + 0,1 % Methylal + 0,1 % mineralische Nährsalzlösung (0,4 % Calciumnitrat + 0,2 % Magnesiumsulfat + 0,4 % Monokaliphosphat).

Nach 2 Tagen schon etwas Fäulnisgeruch.

Nach 4 Tagen in den oberen 2 cm der 12 cm hohen Flüssigkeitssäule Bakterientrübung.

b) Ebenso aber 0,2 $^0/_0$ Methylal.

Nach 2 Tagen schon etwas Fäulnisgeruch.

Nach 4 Tagen in den oberen 1,5 cm der Flüssigkeit Bakterientrübung.

c) Ebenso aber 0,5 $^0/_0$ Methylal.

Nach 2 Tagen etwas Fäulnisgeruch.

Nach 4 Tagen oben Bakterien.

d) Ebenso aber 1 $^0/_0$ Methylal.

Nach 2 Tagen ganz schwacher Fäulnisgeruch.

Nach 4 Tagen oben, 1 cm hoch, Bakterientrübung.

Somit war überall, sogar bei 1 $^0/_0$ Methylal, Fäulnis eingetreten.

Zu allen Versuchen war gewöhnliches nicht gekochtes Wasserleitungswasser genommen worden.

Es ist zu verwundern, daß sogar bei 1 $^0/_0$ Methylal noch Bakterien wuchsen, sie schienen mit dem Wasserleitungswasser hereingekommen oder aus der Luft angeflogen oder den Gefäßen angehängt zu sein.

Der zugesetzte Nährstoff war nun allerdings der denkbar beste, er war auch sehr reichlich vorhanden; 1 $^0/_0$ Pepton dürfte sogar den anspruchsvollsten Bakterien als C- und N-Quelle genügen.

Das Methylal selbst mag hierbei wohl gar nicht angegriffen worden sein, nachdem eine anderweitige organische Nahrung von erster Qualität zur Verfügung stand.

Ich glaube nicht, aus obigen Versuchen den Schluß ziehen zu müssen, daß das Methylal Bakterien ernährt, da ja die gleichzeitige Peptonnahrung alles Bakterienwachstum erklärt.

Übrigens scheinen die anaeroben Bakterien durch Methylal am Wachstum verhindert zu sein.

Denn in der Tiefe wuchsen trotz Peptonanwesenheit keine Bakterien, auch nicht binnen 8 Tagen.

Vielleicht erfolgte durch die Bakterientätigkeit eine Aldehydbildung aus Methylal, wodurch die Anaeroben mehr gehindert wurden als die gewöhnlichen Bakterien.

Aldehyde sind nach Kitasato und Weyl für Anaeroben scharfe Gifte (Z. Hyg. 8, 41).

Auch die anfänglich, binnen 4 Tagen, gewachsene Bakterienvegetation machte dann trotz der ausgezeichneten Peptonnahrung keine weiteren Fortschritte, es blieb bei der 2—4 cm

Tabellarische Übersicht der oben beschriebenen Versuchsergebnisse.

Name der Versuchspflanze	Dauer des Versuches	Gesamtgewicht des aufgegossenen Methylalkohols	Gewicht der Pflanze am Schlusse	Gewicht der Kontrollpflanze	Bemerkungen
Kohlpflanze (Wirsing) als 2 g schwere Keimpflanze im Topf eingesetzt und mit 0,2 % iger **Methylalkohol**-Lösung, der auch 0,1 % Nährsalz beigemischt war, regelmäßig begossen. Der Topf faßte zirka 10 kg Erde. Neben der Methylalkoholernährung ging die Kohlensäureassimilation vor sich, da die Pflanze in freier Luft vor einem Südostfenster stand.	3 Monate, die Pflanze war zu dieser Zeit noch nicht ausgewachsen, aber in guter Entwicklung	Zirka 50 g. Erde ohne Methylalkoholgeruch.	**Gesamt 164,5 g** Wurz. 9,8 Steng. 22,5 Blätt. 132,2	Ohne Methylalkohol erreichte eine gleiche Pflanze binnen 3 Monaten nur das Gesamtgewicht **74,5 g** Wurzel 13,5 Stengel 8,0 Blätter 53,0	Die Nährlösung enthielt Methylalkohol 0,2 %, Nährsalz 0,1 %, also eine zur Ernährung der Pflanze mehr als ausreichende Menge. Die Konzentration 0,2 % wirkte durchaus nicht schädlich (manche Bakterien wachsen sogar in 5 % iger Lösung des CH_3OH als einziger C-Quelle).
Roggen u. Methylalkohol 0,2 % (+ 0,1 % Nährsalz). Topfpflanzen aus Samen gezogen, die selbst von Methylalkohol-Roggenpflanzen im Jahre zuvor hervorgebracht worden waren.	3 Monate und 10 Tage. Die Roggenpflanze hatte bereits Ähren gebildet und nach dem Verblühen Früchte angesetzt. Aussehen viel kräftiger als das der Kontrollpflanze.	Zirka 20 g. Die Erde wies keinen Geruch nach Methylalkohol auf, er war also verbraucht worden.	Gesamt **24,0 g,** Wurzel 9,5 g. Stengel u. Blätter 14,5 g.	Ohne Methylalkohol erreichte eine gleiche Pflanze das Gesamtgewicht **11,2 g.** Wurzel 4,6, Stengel und Blätter 11,2 g.	Der jedenfalls überschüssig zugeführte Methylalkohol mußte teils von Mikroorganismen des Bodens verwendet, teils in der Pflanze zur Verbrennung gelangt sein.

Tabellarische Übersicht (Fortsetzung).

Name der Versuchspflanze	Dauer des Versuches	Gesamtgewicht des aufgegossenen Methylalkohols	Gewicht der Pflanze am Schlusse	Gewicht der Kontrollpflanze	Bemerkungen
Bohnen und Methylalkohol. Feuerbohnen wurden als Wasserkulturen aufgezogen mit a) 2 %, b) 1 %, c) 0,5 % Methylalkohol.	28 Tage.		Die Pflanze mit 2 % Methylalkohol war nach 14 Tagen von allen am stärksten entwickelt.	Der Kontroll-Versuch blieb in der Entwicklung weit hinter den Methylalkoholpflanzen zurück.	Hier fällt die hohe Konzentration auf, in der CH_3OH die beste Ernährungs-Wirkung zeigt.
Sojabohne als Wasserkultur mit 0,5 % Methylalkohol (+0,1 % Nährsalz).	35 Tage.		Entwicklung sehr günstig, Pflanze kräftiger als die Kontrollpflanze.		
Araucaria und Methylalkohol 1 % (+0,1 % Nährsalz). Die eine Topfpflanze wurde mit dieser Lösung begossen, die anderen (Kontrollpflanze) nur mit mineralischer Nährlösung.	3 Jahre.		Die Methylalkoholpflanze blieb allmählich in der Entwicklung zurück, die Triebe waren kürzer und anscheinend starrer.	Die Kontrollpflanze war nach 3 Jahren wesentlich größer, dabei in allen Teilen schlanker als die Methylalkoholpflanze.	1 % Methylalkohol wirkt hier offenbar wachstumshemmend. Ob geringere Konzentrationen günstiger wirken, wurde nicht ausprobiert.
Spirogyren und Methylalkohol.	einige Tage.	Spirogyren-Lösung bilden in 0,1 %iger Lösung Stärke (im Licht) auch bei Kohlensäureausschluß.		B. Landw. Vers. St. 1889 S. 29.	B. und Hab.-Sch. Erlangen 1888.
Gurkenkeimlinge u. Methylalkohol.	3 Wochen.	0,5 % Methylalkohol wirkt schädlich.			0,5 % Methylalkohol dürfte wohl bei vielen Pflanzen eine etwas zu starke Konzentration bilden.
Möhrenkeimlinge u. CH_3OH.	3 Wochen.	0,5 % Methylalkohol wirkt schädlich.			
Kopfsalatkeimlinge und CH_3OH.	3 Wochen.	0,5 % Methylalkohol wirkt schädlich.			

Tabellarische Übersicht (Fortsetzung).

Name der Versuchspflanze	Dauer des Versuches	Gesamtgewicht des aufgegossenen Methylalkohols	Gewicht der Pflanze am Schlusse	Gewicht der Kontrollpflanze	Bemerkungen
Fichtenkeimlinge u. CH_3OH.	20 Tage.	0,5 % Methylalkohol wird nicht nur ertragen, sondern wirkt vorteilhaft.			Wie vorher.
Kohl (Wirsing) und Glycerin (0,25 %), Anfangsgewicht der Pflanze 2 g. Großer Topf.	3 Monate.	Gewicht des aufgegossenen Glycerins: zirka 50 g.	Gewicht d. $C_3H_8O_3$-Pflanze am Schlusse: Gesamt 138,1 g. Wurzel 10,5 g Stengel 21,1 g Blätter 106,5 g.	Gewicht der Kontrollpflanze am Schluß 74,4 g Gesamt, davon Wurzel 13,6 Stengel 7,9 Blätter 52,9	Die ausgiebige Ernährung der Kohlpflanze durch Glycerin ist wohl zweifellos festgestellt.
Spirogyren u. Glycerin	10 Tage. 5 Tage.	Menge der Glycerin Lösung: 250ccm aq. dest. mit 5 Tropfen konzentriertem Glycerin.	10 g Algen verbrauchten binnen 10 Tagen 0,168 g Glycerin. 10 g Algen verbrauchten binnen 5 Tagen 0,0664 g Glycerin.	Bei Kohlensäureausschluß bilden Spirogyren im Lichte aus Glycerin Stärke. Sauerstoffanwesenheit hierzu nicht durchaus nötig.	Verf. in Arch. f. d. ges. Physiol. 125 u. 89.
Kohl (Wirsing) und Methylal (0,2 %). Anfangsgewicht der Pflanze zirka 2 g. Großer Topf.	3 Monate.	Gewicht des aufgegossenen Methylals: zirka 40 g.	Gewicht der Methylalpflanze am Schlusse: Gesamt 125,8 g. Wurzel 15,2 g Stengel 18,1 g Blatt 92,5 g.	Gewicht der Kontrollpflanze am Schluß: Gesamt: 73,8 g. Wurzel 13,2 Stengel 7,9 Blätter 52,7	Ernährende Wirkung des Methylals ersichtlich.

Tabellarische Übersicht (Fortsetzung).

Name der Versuchspflanze	Dauer des Versuches	Gesamtgewicht des aufgegossenen Methylalkohols	Gewicht der Pflanze am Schlusse	Gewicht der Kontrollpflanze	Bemerkungen
Erbsen und Methylal (0,2 %). Topfpflanzen-Versuch.	100 Tage.	Zirka 20 g.	Gewicht der Methylalpflanze am Schlusse 9,40 g. Die Pflanze schien durch 0,2 % Methylal geschädigt zu werden.	Gewicht der Kontrollpflanze am Schluß: 11,43 g.	Die Konzentration des Methylals müßte bei Versuchen mit Erbsenpflanzen geringer als zu 0,2 % genommen werden.
Roggen und Methylal (0,2 %). Topfpflanzen-Versuch.	3 Monate.	Zirka 20 g.	Gewicht der Methylalpflanze am Schluß: Gesamt **16,6 g.** Wurzel 3,1 Oberird. Teil 13,5.	Gewicht der Kontrollpflanze am Schluß: Gesamt **13,3 g.** Wurzel 2,8 Oberird. Teil 10,5.	Unterschied zwischen Methylal- u. Kontrollpflanze nicht groß, aber doch deutlich u. zugunsten desMethylals,
Sommerweizen und Methylal (0,2 %). Topfpflanzenversuch. Hier wie im vorigen Versuch wurden Samen verwendet, die im Jahre vorher aus Methylalpflanzen erhalten worden waren.	3 Monate.	Zirka 20 g.	Gewicht der Methylalpflanze am Schluß: Gesamt **24,0 g,** Wurzel 6,5 g, Oberird. Teil 17,5 g.	Gewicht der Kontrollpflanze am Schluß: Gesamt **17,0 g,** Wurzel 4,8 g, Oberird. Teil 12,2 g.	Methylal (0,2 %) ernährt die Weizenpflanze.
Algen und Methylal.	In Methylallösung 0,1 % bilden entstärkte Spirogyren bei Kohlensäureausschluß im Lichte rasch Stärke (Ver., Habil.-Schr. Erlangen 1888).				

tief heruntergehenden Bakterientrübung ohne stärkere Hautbildung mit allmählich eintretender grünlicher Fluorescenz.

Der Methylalzusatz tut also der Bakterienentwicklung in Peptonlösung Einhalt oder behindert sie.

Die Begießung einer im Topf gezogenen 20 cm hohen

Topfpflanze von Brassica oleracea zeigte ähnliches; sie erhielt Lösung: Pepton 1 % + Methylal 0,2 % + Mineral.

Zuerst Fäulnisgeruch in der Erde, dann Verschwinden dieses Geruches und Erholung der anfänglich geschädigten Pflanze.

Ich glaube also nicht, daß der Methylalgehalt der obengenannten Lösung, die zum Begießen der Methylal-Topfpflanzen verwendet wurde, im Boden eine erhebliche Schwächung erfuhr.

Vermutlich ging der größte Teil des Methylals in die Versuchspflanzen hinein und wurde dort teils zur Ernährung verwendet, teils verbrannt.

Schlußbemerkungen.

Die organische Ernährung grüner Pflanzen ist eine Frage von nicht untergeordneter Bedeutung.

Denn fürs erste hat daran die Landwirtschaft ein besonderes Interesse.

Einige Zeit wurde die organische Ernährung der landwirtschaftlichen und anderer grüner Pflanzen überhaupt in Abrede gestellt.

Letztere sollen nur Kohlensäure zur Bildung organischer Substanz verwenden.

Das ist entschieden zu weit gegangen.

Jos. Böhm, dann W. Schimper und Arthur Meyer, ferner Klebs, dann O. Loew, Cremer, Verfasser und andere haben gezeigt, daß grüne Pflanzen, Kartoffeltriebe und andere Blütenpflanzen aus verschiedenen Zuckerarten, wenn diese von außen zugeführt werden, Stärke bilden, und daß dieser Prozeß auch im Dunkeln vor sich geht.

Den Zuckerarten schließt sich das Glycerin an. Es geht verhältnismäßig leicht innerhalb der Pflanzenzelle in Stärke über.

Im Vorstehenden wurde gezeigt, daß auch grüne Blütenpflanzen, wie der Kohl, das Glycerin zur Ernährung benutzen können.

Ebenso den Methylalkohol, das Methylal.

Aber auch zahlreiche andere Stoffe können assimiliert werden.

Freilich ist das bisher meist nur an Algen ausprobiert worden.

Die Fähigkeit der Algen und anderer grüner Pflanzen, organische Stoffe aller Art zu verarbeiten, ist geradezu staunenswert.

So können Spirogyren aus Essigsäure, einem der Fäulnisprodukte, Stärke fabrizieren.

Stellt man sich aus Eisessig eine 0,1 %ige Essigsäure her und neutralisiert die saure Lösung mit Kalkwasser, so erhält man eine Nährflüssigkeit, in der Spirogyren binnen 2 Tagen, bei Lichtzutritt und unter Ausschluß von Kohlensäure Stärke speichern.

Setzt man gleichzeitig einen Kontrollversuch mit reinem Wasser an, so bilden die Spirogyren in diesem keine Stärke.

Ferner zeigt schon das makroskopische Aussehen der beiderlei Algen, daß in einem Falle Ernährung stattfindet, im andern nicht.

Die mit essigsaurem Kalk ernährten Algen wachsen, breiten sich in der Flüssigkeit aus, die andern knäueln sich zusammen, als ob der eine Faden von den andern, d. h. den in ihm angehäuften und beim Absterben austretenden Nährstoffen leben wollten.

Das Resultat mit Essigsäure ist deswegen besonders bemerkenswert, weil die Essigsäure unter den Fäulnisprodukten auftritt und somit im Boden vorhanden sein muß, wenn eine Fäulnis von Pflanzen- oder Tierüberresten stattfindet, was im bebauten Boden ein tagtäglicher Vorgang ist.

Die Neutralisation mit Kalk tritt dort ebenfalls ein, da der Kalk zu den häufigsten Bodenbestandteilen gehört.

Andere bei der Fäulnis auftretende flüchtige Fettsäuren, wie Buttersäure und Baldriansäure, vermögen den Algen ebenfalls als Nahrung zu dienen, wie Verfasser früher gezeigt hat (Chem.-physiol. Beiträge zur Frage der Selbstreinigung der Flüsse, Chem.-Ztg. 1913). Die Säuren wurden ebenfalls 0,1 %ig angewendet und mit $Ca(OH)_2$ neutralisiert. Stärkebildung in den Spirogyren trat auf.

Auch Milchsäure gehört zu den Fäulnisprodukten.

0,1 %ige Lösung wurde mit Kalkwasser neutralisiert.

Hineingesetzte Spirogyren zeigten binnen 2 Tagen Stärkeansatz, trotz völligen Kohlensäureausschlusses.

Bernsteinsäure, eine weitere bei der Fäulnis auftretende Fettsäure, ergab bei gleicher Versuchsanstellung ebenfalls positives Resultat.

Auch in 0,1 %iger Zitronensäure, mit Kalkwasser neutralisiert, setzten die Spirogyren trotz Kohlensäureausschluß Stärke an.

Weinsäure gibt als Calciumbitartrat gleichfalls Stärkebildung in Spirogyrenzellen.

Calciumbimalat ebenfalls (Verf. in Chem.-Ztg. 1899, **18**, Nr. 2).

Aus der Reihe der Amidokörper, die bei der Fäulnis auftreten, wurden Glykokoll, Tyrosin und Leucin vom Verf. geprüft. Aus ihnen bilden Algen reichlich Stärke.

Auch Asparaginsäure, Hydrantoin, Urethan, Kreatin, Betain- und Neurinsalze wirken ernährend (O. Loew und Th. Bokorny, Chem.-physiol. Studien über Algen, J. pr. Ch. **36**). Die betreffenden Versuche seien wegen ihres Interesses für vorliegende Frage wörtlich zitiert:

„Schon vor mehreren Jahren versuchten wir Vaucheria und Spirogyra mit Pepton, Asparaginsäure oder Glycerin zu ernähren. Um die Assimilationstätigkeit für Kohlensäure hierbei auszuschließen, wurden die Versuche im Dunkeln angestellt.

Jedoch stellten sich bei all diesen Versuchen sehr bald eine große Menge von Spaltpilzen ein, die durch ihre intensive Tätigkeit die Algen schädigten und nach mehreren Wochen zum Absterben brachten, entweder durch Säurebildung aus diesen Nährstoffen (aus Glycerin) oder durch Ammoniakabspaltung (aus Pepton und Asparaginsäure).

Nun versetzten wir eine Portion Algen in 1 pro mille-Lösung von Asparaginsäure unter Zusatz einer Spur von Magnesiumsulfat, Monokaliumphosphat und Eisenphosphat, brachten sie ins Dunkle und erneuerten jeden zweiten Tag die Lösung vollständig (d. h. die Algen wurden herausgenommen, abgewaschen und in frische Nährlösung gebracht).

Bei dieser Behandlung blieben sie vollständig gesund, obwohl sie gar keinen Stärkemehlvorrat mehr besaßen, während sie unter gewöhnlichen Umständen nach Aufzehrung ihres Stärkevorrats den Hungertod verfallen.

In diesem Falle ist der ernährende Einfluß der Asparaginsäure evident.

Die Zellen erlangten eine Breite von 48 Mikromillimeter und eine Länge von 220 Mikromillimeter, während sie ohne Asparaginsäure 30 Mikromillimeter und 150 Mikromillimeter maßen."

„Läßt man organische Materien bei Zutritt von Licht mit Algen in Berührung, so gedeihen letztere viel besser.

Die Vermehrung der Algen ist eine beträchtliche, wenn dem Kulturwasser 0,1 % Asparaginsäure zugesetzt wird, und dabei sind die Algen in außerordentlich kräftigem Zustande, von schönem Aussehen.

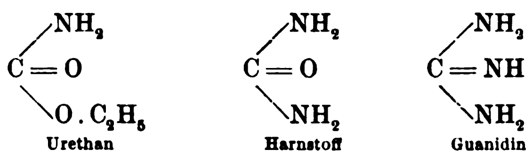
Auch in einer Lösung mit 0,1 %iger **Bernsteinsäure** leben die Algen ohne Störung fort, jedoch ohne beträchtliche Vermehrung zu zeigen; nur die Stärkekörner machen sich durch bedeutende Größe bemerklich.

In Äpfelsäure oder Cumalinsäure von derselben Stärke sterben die Algen schon nach etwa 24 Stunden, was mit dem stärker sauren Charakter dieser Säuren zusammenhängt (bei Cumalinsäure kann auch deren leichte Einwirkung auf Amidogruppen [im Eiweiß] in Betracht kommen).

Bei 10mal größerer Verdünnung werden indessen auch diese Säuren ertragen.

Ebenso nimmt der schädliche Einfluß zu, wenn in einer Substanz durch Eintritt stickstoffhaltiger Gruppen die Alkalizität zunimmt.

Sehr lehrreich ist in dieser Beziehung ein Vergleich von Urethan, Harnstoff und Guanidin:



Urethan Harnstoff Guanidin

Setzt man Algenfäden in 0,1 %igen Lösungen dieser Stoffe in Quellwasser, so nehmen sie bei Urethan auch nach Wochen nicht den geringsten Schaden.

Bei Harnstoffzufuhr kränkeln sie nach einigen Tagen, bei Guanidinernährung sterben sie unter Granulationserscheinungen schon nach einigen Stunden ab.

Treten in die Moleküle des Harnstoffs oder Guanidins Säuregruppen ein, die den alkalischen Charakter abschwächen, so verschwindet auch wieder die schädliche Wirkung, wie Versuche mit Hydantoin und Kreatin ergaben:

```
NH — CO             NH2
|      |            |
CO     |            C(NH)
|      |            |
NH — CH2            N(CH3) — CH2 — COOH
```

Hydantoin Kreatin

Nach fünftägiger Einwirkung von 0,2 %igen Lösungen von Kreatin, Hydantoin, Urethan, Leucin, Sulfoharnstoff und Harnstoff stellte sich ein sehr bemerkenswerter Unterschied in der Wirkung der einzelnen Stoffe heraus.

Die in Kreatin- und Hydantoinlösung gewesenen Algen hatten bedeutend an Masse zugenommen, die in Urethan und Leucin erwiesen sich als vollkommen gesund, waren aber nicht so gewachsen.

Die in Harnstoff- und Sulfoharnstofflösung gewesenen Algen zeigten keine Massenzunahme und ergaben folgenden mikroskopischen Befund:

Bei Harnstoff waren die Fäden meist dem Tode nahe; die Chlorophyllbänder waren stärkeleer, ohne Zacken und zusammengeschrumpft, öfters zerrissen; das farblose Plasma war meist intakt, manchmal contrahiert, nur hier und da (sehr selten) granuliert. Die schädliche Einwirkung kann also hier nicht oder nur zum kleinsten Teil auf Ammoniakabspaltung zurückgeführt werden.

Die Algen in 0,2 $^0/_0$ Sulfoharnstoff waren ebenfalls meist dem Tode nahe, zeigten aber in vielen Zellen noch Stärkemehlgehalt.

Der günstige Effekt des Kreatins und Hydantoins ist ohne Zweifel der im labilen Zustande darin enthaltenen CH_2-Gruppe zuzuschreiben.

Während Guanidin, Harnstoff und Sulfoharnstoff wegen mangelnder CH_2-Gruppe nicht nur nicht ernähren, sondern infolge ihrer basischen Natur auch schädliche Wirkung äußern, können viele andere organische Stoffe von Algen oder Pilzen ertragen werden, ohne zur Ernährung zu dienen, z. B. pikrinsaures und nitranilsaures Kali in 0,05 $^0/_0$iger Lösung. Im Lichte bleiben die Algen in deren Lösungen am Leben, im Dunkeln aber sterben sie bald des Hungertodes. Ähnlich verhält es sich mit den Pilzen gegenüber Pyridinsalzen und Amidobenzoesäure, während phenylessigsaure Salzewieder zur Ernährung beitragen können, wegen der vorhandenen CH_2-Gruppe.

Ohne Zweifel können auch solche Stoffe, die unter Wasseraufnahme die CH_2-Gruppe zu bilden fähig sind, zur Ernährung beitragen."

Man sieht, wie die Ernährungskraft der organischen Stoffe mit der chemischen Konstitution derselben zusammenhängt.

Es gibt zweifellos eine große Zahl von organischen Stoffen, die auch grüne Pflanzen zu ernähren vermögen.

Nur ist bei höheren Pflanzen der Beweis nicht so leicht zu erbringen, wie bei Spirogyren. Die Versuche dauern dort viel länger.

Trotzdem wäre es eine dankenswerte Arbeit, den Beweis in ähnlicher Weise, wie oben angegeben, auch bei Blütenpflanzen zu führen.

Verf. konnte wegen Mangels an Zeit nur für wenige organische Stoffe die Ernährungsfähigkeit bei einigen Topfpflanzen und bei Wasserkulturen aus dem Kreise der phanerogamen Kulturpflanzen experimentell nachweisen.

Sicherlich gelingt es auch bei andern Stoffen und Pflanzen.

Das sich daran knüpfende Interesse ist ein doppeltes.

Fürs erste ein rein physiologisches, indem damit die Kluft zwischen grünen Pflanzen und Pilzen immer mehr überbrückt wird und auch die Ernährung der Kulturpflanzen in weiterem Gesichtskreis als bisher betrachtet wird.

Fürs zweite ein praktisches, weil mit der organischen Ernährbarkeit der Kulturpflanzen auch ein besseres Verständnis der Vorteile eines guten Humusbodens angebahnt wird.

Verf. ist durchaus nicht der Meinung, daß sich damit allein die gute Wirkung des Humusbodens erklären lasse.

Denn die feine Verteilung des Bodens spielt sicherlich auch eine große Rolle.

Nichts aber hindert uns, anzuerkennen, daß auch die organischen Stoffe des Bodens, speziell die obengenannten organischen Fäulnisprodukte, zu dieser vorteilhaften Wirkung beitragen, wenn auch bei Kulturpflanzen der Nachweis erbracht wird, daß jene Stoffe Nährstoffe für sie sind.

Über die Verwertung des Blutes[1]) zur menschlichen Ernährung und das Verhalten des Formaldehyds im Organismus.

Von

E. Salkowski.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 14. Juli 1915.)

In zwei Artikeln in der Berliner klin. Wochenschr. Nr. 12 und Nr. 23 1915 habe ich mich über die Verwertbarkeit des Blutes der Schlachttiere zur menschlichen Ernährung ausgesprochen. Die nachfolgende Mitteilung soll nun die den erwähnten Erörterungen zugrunde liegenden Unterlagen bringen, die ich in der genannten, vorwiegend klinischen Interessen dienenden Wochenschrift nicht gut ausführlich darstellen konnte.

I. Der Eiweißgehalt des Blutes im Vergleich mit dem des Fleisches.

Über den Eiweißgehalt des Rinderblutes liegen meines Wissens nur wenige Angaben vor. Nach Bunge[2]) beträgt die Summe von Hämoglobin und Eiweiß in diesem Blut 17,3%, Abderhalden[3]) fand bei seiner ersten Untersuchung 8,2% Hämoglobin und 9,1 Eiweiß, zusammen also 17,3%, bei seiner zweiten Analyse[4]) 10,64 Hämoglobin und 6,179% Eiweiß, zusammen also 16,8% Eiweiß. Die zweite Untersuchung bezieht sich auf einen 2jährigen, nicht gemästeten Stier, kommt demnach weniger in Betracht.

Direkte Bestimmungen des Stickstoffgehaltes des Rinderblutes scheinen überhaupt noch nicht gemacht zu sein, wenigstens habe ich in der physiologisch-chemischen Literatur nichts

---

[1]) Alle meine Angaben beziehen sich, die Zuverlässigkeit des Lieferanten vorausgesetzt, ausschließlich auf Rinderblut.

[2]) Bunge, Zeitschr. f. Biol. **12**, 191, 1876.

[3]) Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. **23**, 522, 1897.

[4]) Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. **25**, 73, 1898.

darüber finden können; es schien mir zweckmäßig, diese Lücke durch einige Bestimmungen auszufüllen.

Es liegt sehr nahe, für diesen Zweck das Blut, als Flüssigkeit, nicht abzuwägen, sondern abzumessen; dabei bildet aber die viscöse Beschaffenheit des Blutes eine anscheinend unüberwindliche Schwierigkeit, daß sie indessen bei entsprechendem Verfahren überwunden werden kann, zeigen die von mir ausgeführten Doppelanalysen und vergleichende Bestimmungen an demselben Blut, einerseits abgemessen, andererseits abgewogen.

Die Abmessung der zur N-Bestimmung verwendeten Quantität Blut geschah nach dem in meinem Praktikum der physiologischen Chemie, 4. Auflage, S. 304 beschriebenen Verfahren, das ich mit einigen Nebenbemerkungen hier wiedergeben möchte.

Man mißt mit einer Vollpipette 25 ccm Blut ab, wobei darauf zu achten ist, daß die Pipette nicht mehr als durchaus notwendig in das Blut eingetaucht wird, und läßt es in ein 100 ccm-Kölbchen fließen, spült die Pipette so lange mit Wasser nach, bis das Wasser höchstens noch einen ganz schwach rötlichen Farbenton zeigt, füllt dann zur Marke auf. Die Spitze der Pipette darf dabei natürlich nicht von außen abgespült werden. Bei einiger Geschicklichkeit läßt sich der Fehler, daß etwas von dem außen noch anhängenden Blut in das Kölbchen gelangt, ganz gut vermeiden. Nach sorgfältigem Durchmischen durch mehrmaliges sanftes Umdrehen des Kölbchens entnimmt man mit der Pipette 10 ccm des verdünnten Blutes und läßt in den Kjeldahlkolben fließen, jetzt ohne nachzuspülen. Sehr lästig ist dabei, daß sich beim Durchmischen des Blutes mit Wasser nicht selten ein sehr haltbarer Schaum bildet. Zur Vermeidung dieser Schwierigkeit empfiehlt es sich, das Kölbchen nicht ganz bis zur Marke mit Wasser aufzufüllen, sondern etwa 2 mm unter dem Strich zu bleiben. Bringt man jetzt ein Tröpfchen Alkohol auf den Schaum, so verschwindet er sofort, eventuell fügt man noch etwas Wasser hinzu. Der Alkohol schwimmt dann allerdings auf dem verdünnten Blut: durch einmaliges Umkehren des Kolbens mischt man ihn unter. Bildet sich dann aufs neue Schaum, so muß man warten, bis sich derselbe abgesetzt hat oder ihn mit oben geschlossener Pipette gewissermaßen durchstechen und das verdünnte Blut erst aufsteigen lassen, wenn die Pipette sich im Kolben befindet. Auch dabei empfiehlt es sich, die Pipette nicht zu tief einzutauchen, man wählt daher zweckmäßig ein Kölbchen, dessen Marke sich recht nahe über dem Bauch des Kölbchens befindet.

In dieser Weise habe ich 6 Blutproben, die aus einer Quantität von 1 bis $1^1/_2$ Liter (defibriniert) stammten, unter Anwendung von Kupfersulfat und Quecksilberoxyd untersucht, wobei meistens zum Schluß bei der Oxydation noch etwas Kaliumpermanganat hinzugesetzt wurde.

100 ccm Blut enthielten danach Stickstoff in Grammen:

Nummer der Blutprobe	a)	b)	Mittel
1[1])	3,27	3,30	3,29
2	2,92	2,94	2,93
3	2,92	2,87	2,90
4	3,27	3,22	3,25
5	3,21	3,20	3,21
6	3,18	3,22	3,20

Die Übereinstimmung der Doppelbestimmungen ist sehr nahe, man sieht also, daß man auf diesem Wege zu übereinstimmenden Resultaten gelangen kann, wenn auch die Ausführung einigermaßen schwierig ist.

Bezüglich der Bildung einer Mittelzahl befinde ich mich in einiger Verlegenheit: man kann sich doch nur schwer zu der Annahme entschließen, daß das wesentlich geringere Ergebnis in den beiden Bestimmungen 2 und 3 wirklich in der Natur der Sache begründet sein sollte, und nicht vielmehr auf einen Gehalt an Wasser zurückzuführen sein sollte. Es braucht sich ja nicht um einen absichtlichen Zusatz von Wasser zu handeln, sondern um eine Zufälligkeit; volle Sicherheit würde man in diesem Punkte nur erlangen können, wenn man das Auffangen des Blutes, Schlagen und Kolieren selbst überwachen würde.

Macht man nicht die Annahme eines von außen stammenden Wassergehaltes in den Blutproben 2 und 3, hält vielmehr auch diese für genuines Blut, so ergibt sich als Mittelzahl ein Gehalt von 3,13 g N in 100 ccm Blut, im Mittel der Bestimmungen 1, 4, 5 und 6, dagegen von 3,24 g N. Von der Blutprobe Nr. 6 wurde gleichzeitig eine Bestimmung mit abgewogenen Mengen Blut[2]) vorgenommen. Das Blut wurde im Wägegläschen gewogen, dann mit viel Wasser in den Kjeldahlkolben gespült. Die Doppelbestimmung ergab 2,98 bezw. 2,93 %, im Mittel 2,96 %[2]).

Um die Bestimmung mit Hilfe von Abmessen mit der durch Abwägen ausgeführten vergleichen zu können, muß man nun das im ersten Falle erhaltene Resultat durch das spezifische Gewicht des Blutes dividieren; leider ist dasselbe nicht bestimmt worden.

---

[1]) Die Nummern entsprechen der zeitlichen Reihenfolge. Die 6 Proben wurden in einen Zeitraum von etwa 8 Wochen — von Anfang März bis Anfang Mai — untersucht.

[2]) a) 2,3275 g Blut erforderten zur Bindung des NH_3 24,8 ccm $^n/_5$-Säure.
b) 2,4865 g „ „ „ „ „ „ 26,0 „ „ „

In der Literatur habe ich Angaben über das spezifische Gewicht von Rinderblut nicht finden können. Für das spezifische Gewicht menschlichen Blutes gibt Landois-Rosemann[1]) bei Männern 1055 bis 1060 an. Legt man, um keine zu günstige Annahme zu machen, letztere Zahl zugrunde, so ergibt sich für das Blut Nr. 6 ein N-Gehalt von 3,04%, was mit der direkten Gewichtsbestimmung von 2,96% nahe übereinstimmt.

Für die Mittelzahl 3,13 g in 100 ccm berechnet sich ein Prozentgehalt von 2,95%, für die Mittelzahl 3,24 ein Prozentgehalt von 3,06%.

Was das Rindfleisch betrifft, so fand Voit für solches Fleisch, das durch sorgfältigstes Präparieren von allem sichtbaren Fett befreit war, 3,4% N. Bei zahlreichen Analysen, die teils von mir selbst[2]), teils von Laboranten in Stoffwechselversuchen hier ausgeführt sind, ergab sich für das beste Rindfleisch, das noch von sichtbarem Fett befreit war, wenn auch nicht mit so großer Sorgfalt wie bei Voit, 3,3%. Höher wird man den N-Gehalt des besten vom Publikum gekauften Fleisches sicher nicht annehmen können.

Wie berechnet sich nun der Eiweißgehalt aus dem N-Gehalt?

Was das Blut betrifft, so kann man wohl von dem minimalen Gehalt an sogenanntem Rest-N ganz absehen, dagegen ist der übliche Faktor 6,25 nicht ohne weiteres zulässig. Für das Eiweiß des Blutserums und der Blutkörperchen kann man diesen Faktor wohl gelten lassen, für das Hämoglobin dagegen nicht. Dieses enthält nach Fr. N. Schultz[3]) 17,33% N. Nehmen wir, um die Rechnung für das Blut keinesfalls zu günstig zu gestalten, an, daß die Eiweißkörper desselben zu $^2/_3$ aus Hämoglobin, zu $^1/_3$ aus Eiweiß mit 16% N bestehen, so erhält man einen mittleren N-Gehalt von 16,89%, danach als Faktor 5,92.

Aus dem N-Gehalt von 2,96% berechnet sich ein Eiweißgehalt von 17,52%, aus dem N-Gehalt von 3,06% ein Eiweißgehalt von 18,12%.

Was den Eiweißgehalt des Fleisches betrifft, so entfallen nach v. Fürth und Schwarz[4]) auf den Extraktiv-N desselben 0,327

---

[1]) Lehrbuch der Physiol. 12. Aufl., **1**, 27.

[2]) Diese Zeitschr. **19**, 127, 1909.

[3]) Fr. N. Schultz, Zeitschr. f. physiol. Chem. **24**, 469.

[4]) v. Fürth und C. Schwarz, diese Zeitschrift **30**, 432, 1911. Die Angaben beziehen sich allerdings auf Pferdefleisch und Hundefleisch, solche für Rindfleisch scheinen nicht vorzuliegen.

bis 0,382 % N, im Mittel 0,355, es bleiben somit für das Eiweiß des Fleisches 3,3 minus 0,355 = 2,945 % N = 18,41 % Eiweiß.

Danach enthält ein Kilo Rindfleisch nur ganz unbedeutend mehr Eiweiß als 1 Kilo Rinderblut.

Bezieht man, was wohl das Natürlichste ist, den Eiweißgehalt des Blutes auf 1 Liter, so ergeben sich nach den 6 Analysen 185,9 g Eiweiß im Liter, nach den 4 Analysen (unter Fortlassung von Analyse 2 und 3) 194 g Eiweiß, also noch etwas mehr als im Fleisch.

II. Wie wird das Eiweiß des Blutes ausgenutzt?

Bezüglich dieser Frage kann ich auf die Ausführungen in meiner Arbeit über Fleischersatzmittel in dieser Zeitschr. Band 19 verweisen, namentlich auf Seite 105. Aus den hierauf bezüglichen Versuchen geht hervor, daß das getrocknete gepulverte Blutkoagulum fast ebenso gut ausgenutzt wird wie Fleisch. Es ist selbstverständlich, daß die Ausnutzung des feuchten Blutkoagulums, bzw. des in toto ohne Wasserzusatz koagulierten Blutes nicht schlechter sein wird, einen hierauf bezüglichen Versuch werde ich weiter unten mitteilen.

III. Die Stoffwechselwirkung des genossenen Blutes.

Die Eiweißkörper des Blutes bestehen zu fast $^2/_3$ aus Hämoglobin, zu etwas mehr als $^1/_3$ aus eigentlichen Eiweißkörpern. Das aus dem Hämoglobin durch Spaltung hervorgehende Globin ist nach den Untersuchungen von Fr. N. Schultz bekanntlich kein Eiweiß, sondern ein Histon bzw. eine dem Histon sehr nahestehende Substanz. Es enthält außerdem nur 0,42 % Schwefel. Danach ist es a priori keineswegs sicher, daß die Eiweißkörper des Blutes imstande sind, das Fleisch völlig zu ersetzen. Die Anstellung eines Bilanzversuches stößt nun auf die große Schwierigkeit, daß die Hunde nicht zu einer ganz regelmäßigen Aufnahme des koagulierten Blutes feucht oder in Pulverform zu bewegen sind.

Als Ersatz für einen Bilanzversuch habe ich in der oben zitierten Arbeit einen Versuch mitgeteilt, der sich auf nicht weniger als 29 Tage erstreckt und in dem ein Hund Blutkoagulum als einzigen Eiweißkörper erhielt, daneben nur noch etwas Reis und Speck. Da der Hund sich während der

ganzen Zeit völlig wohl befand, Verdauungsstörungen nicht eintraten, das Körpergewicht am Schluß des Versuches noch etwas größer war, als am Anfang, so kann man damit wohl mit Sicherheit den Beweis, daß man an Stelle von Fleisch die Eiweißkörper des Blutes zur Ernährung verwenden kann, als erbracht ansehen. Dabei ist natürlich nicht ausgeschlossen, daß ein Teil des Bluteiweißes dieselbe Rolle gespielt hat, wie der Leim, den man ja auch ohne Schaden für einen gewissen Anteil des Eiweißes in der Nahrung substituieren kann. Übrigens scheint mir, beiläufig bemerkt, die Frage, ein wie großer Teil des N-Gehaltes des Fleisches — abgesehen von dem Extraktiv-N — eigentlichem Eiweiß, ein wie großer leimgebender Substanz angehört, noch durchaus nicht erledigt.

Für die praktische Verwendung von Blutpräparaten beim Menschen würde es sich empfehlen, auf die schwarze Farbe der Faeces nach dem Genuß derselben hinzuweisen, damit der Konsument sich nicht eventuell unnötig beunruhigt.

IV. Über die Konservierung von Blut.

Wenn man, wie es geschehen ist, dem Publikum das Blut als solches zur Herstellung von Speisen empfiehlt, liegt die große Gefahr nahe, daß das Blut nicht völlig frisch in die Hände des Konsumenten gelangt, da die Fäulnis desselben außerordentlich schnell eintritt, besonders im Sommer. Es erhob sich daher die Frage, ob man der Fäulniszersetzung nicht durch Konservierungsmittel vorbeugen könne. Ich habe eine Anzahl von Konservierungsmitteln auf ihre Brauchbarkeit für diesen Zweck geprüft. Die Beobachtung des mit verschiedenen Zusätzen versehenen Blutes, das in Flaschen mit Korkstöpseln aufbewahrt wurde, erstreckt sich auf 3 bis 4 Wochen, eine Zeit, die sicher als ausreichend angesehen werden muß, manchmal auch länger. Als Kriterium schien mir in diesem Falle die Geruchlosigkeit genügend, Überimpfungen auf Nährgelatine nicht erforderlich.

1. Chloroform. Schüttelt man Blut mit wenig Chloroform durch, so erstarrt es in 1 bis 2 Tagen zu einer festen Masse, Chloroform ist aus diesem Grunde also nicht zu brauchen.

2. Ameisensäure. Das mit 1 % Ameisensäure versetzte Blut wandelt sich infolge der Säurewirkung sehr schnell in

eine schwarze bröcklige Masse um, ähnlich wirkt Essigsäure. Diese Säuren sind daher ebenso unbrauchbar wie das Chloroform.

3. Toluol. Blut mit Toluol geschüttelt, bleibt äußerlich zunächst unverändert. Der Toluolzusatz schließt natürlich autolytische Prozesse nicht aus, allein der Gehalt des Blutes an autolytischem, namentlich proteolytischem Ferment ist so gering, daß dieses wenig in Betracht kommt. Übrigens gilt dasselbe wohl für sämtliche Konservierungsmittel und antiseptische Mittel, falls sie nicht in zu hoher Konzentration angewendet werden[1]) und außerdem pflegen wir ja gewohnheitsmäßig bei animalischen Nahrungsmitteln Autolyse nicht auszuschließen, ja wir wünschen sie sogar beim Fleisch. Allmählich nimmt das Blut venöse Beschaffenheit an; in einigen Fällen waren übrigens auf der unteren Fläche des Korkstöpsels Schimmelpilze bemerkbar. Da das Toluol ziemlich flüchtig ist, so konnte man vielleicht vermuten, daß es sich aus dem damit konservierten Blut bei Zubereitung der betreffenden Speise verflüchtigen würde. Um hierüber ein Urteil zu gewinnen, schien es mir am einfachsten, das Blut zu verdünnen, auszukoagulieren, das ausgeschiedene Koagulum nach einigem Abkühlen abzukolieren, zu waschen und abzupressen. Das so erhaltene Eiweiß riecht und schmeckt nun noch mehr oder weniger nach Toluol, so daß an ein Entweichen des Toluols bei der Zubereitung von Speisen nicht zu denken ist.

4. Allylsenföl. Das Senföl steht in dem Rufe eines vorzüglichen Antisepticums: nach den Angaben von R. Koch[2]) tritt eine merkliche Behinderung des Wachstums von sporenfreien Milzbrandbacillen in einer Pepton-Fleischextraktlösung bei einem Gehalt an Senföl von 1 : 330000 ein, eine völlige Aufhebung bei 1 : 33000. Es ergab sich, daß diese Zahlen für Fäulnisbakterien und Blut als Nährsubstrat keine Geltung haben. 1 l Blut wurde mit einigen Tropfen Senföl auf der Schüttelmaschine etwa $^1/_2$ Stunde durchgeschüttelt: schon nach wenigen Tagen roch es stark faulig. Größere Mengen verhindern allerdings die Fäulnis; das ebenso wie beim Toluol hergestellte Eiweißkoagulum roch und schmeckte aber so stark

[1]) Ausgenommen ist Formaldehyd von 1 % und Zucker in gesättigter Lösung (resp. 1 : 1).

[2]) R. Koch, Mitteil. a. d. Kaiserl. Ges.-Amt 1, 271, 1881.

nach Senföl, daß an eine direkte Anwendung des konservierten Blutes in der Erwartung, daß das Senföl bei der Zubereitung der Speise entweichen werde, nicht zu denken ist.

Ich wende mich nun zu den nichtflüchtigen Konservierungsmitteln, die selbstverständlich vor dem Gebrauch des Blutes entfernt werden müssen. Bei diesen handelt es sich also um die Frage, ob die durch Auskoagulieren erhaltenen und einmal ausgewaschenen Eiweißkörper genügend frei sind von dem angewendeten Konservierungsmittel.

5. Borsäure. Das Blut wurde durch Einstellen in den Thermostaten bei 40° oder in Wasser von etwas höherer Temperatur erwärmt, dann in der Reibschale mit Borsäure verrieben, die Lösung derselben durch Schütteln vervollständigt. Der Borsäurezusatz betrug 2 bis 4°/$_0$. Die Proben verhielten sich verschieden. Eine Probe mit 2°/$_0$ wurde schon nach einigen Tagen venös und zeigte nach 10 Tagen deutlichen Fäulnisgeruch, eine andere blieb hellrot und roch nach 3 Wochen noch nicht faulig. Die Verschiedenartigkeit des Verhaltens hat vermutlich folgenden Grund. Selbstverständlich ist das erhaltene Blut nicht steril, darauf würde man auch bei der praktischen Verwendung nicht rechnen können, es ist nun wohl denkbar, daß es in verschiedenem Grade und auch mit Bakterien verschiedener Resistenz verunreinigt ist und sich aus diesem Grunde verschieden gegen Borsäure verhält. Zur Prüfung, ob sich mit dem konservierten Blut ohne zu große Schwierigkeiten ein borsäurefreies Eiweiß erhalten läßt, diente eine mit 4°/$_0$ Borsäure versetzte Blutprobe. 50 ccm derselben wurden mit etwa dem 8 fachen Volumen Leitungswasser verdünnt, auskoaguliert, nachgewaschen und abgepreßt. Das erhaltene Eiweiß wurde dann wiederholt energisch mit destilliertem Wasser ausgekocht, die Auszüge durch Leinwand koliert, schwach alkalisiert, eingedampft, durch Papier filtriert, zur Trockne gedampft. Der Trockenrückstand betrug 0,0434, der Glührückstand desselben 0,0104. Borsäure war darin nicht bestimmt nachweisbar. Da hiergegen noch der Einwand erhoben werden könnte, daß die Borsäure vielleicht durch Wasser aus dem Koagulum nicht extrahiert sein könnte, wurde in einem neuen Versuch das schließlich rückständige Koagulum verascht. Um die Veraschung nicht zu sehr zu erschweren, wurden diesmal nur 20 g

Blut angewendet: in der Asche war nur eine zweifelhafte Spur Borsäure durch Curcumapapier nachweisbar. Seitdem wir, hauptsächlich durch die Untersuchungen von Bertrand wissen, daß kleine Mengen von Borsäure in unsern Nahrungsmitteln ganz verbreitet sind, können solche Reste davon als ganz bedeutungslos gelten.

6. Salicylsäure. Zur Herstellung der Lösung im Blut wurde ebenso verfahren, wie es bei der Borsäure angegeben ist. Der Gehalt an Salicylsäure betrug 2%. Das Blut nahm bald durch die Säurewirkung der Salicylsäure bräunliche Färbung an, hielt sich aber 3 Wochen unverändert.

Zur Prüfung der Frage der Entfernbarkeit wurden 50 ccm des Blutes ebenso wie bei der Borsäure verarbeitet. Die gesammelten Auszüge wurden auf 100 ccm eingedampft, nachdem sie vorher, um eine Verflüchtigung der Salicylsäure zu verhindern, mit Natriumcarbonat schwach alkalisiert waren. Der Gehalt an Salicylsäure wurde auf colorimetrischem Wege annähernd festgestellt.

0,1 g Salicylsäure wurde gelöst, auf 1000 verdünnt und, da die aus dem salicylierten Blut erhaltene Lösung eine gelbe Farbe zeigt, bis zu derselben Farbennuance mit Zuckerkouleur versetzt — ein Verfahren, das ich wiederholt bei der Bestimmung der Salicylsäure angewendet habe, die aus Salicylaldehyd, durch das Oxydationsferment der Leber entstanden war. Beide Lösungen wurden nun mit verdünntem Eisenchlorid versetzt, solange die Färbung noch zunahm. Da die Salicylsäurelösung noch stärker gefärbt erschien, wurde sie auf die Hälfte verdünnt, so daß die Lösung also in 100 ccm 0,005 Salicylsäure enthielt: sie war nun etwas schwächer gefärbt als die zu vergleichende Lösung. 70 ccm dieser auf 100 ccm verdünnt, ergab Farbengleichheit entsprechend einem Gehalt an 0,007 Salicylsäure.

Das auskoagulierte Eiweiß aus 100 ccm salicyliertem Blut enthielt danach 0,014 g Salicylsäure, eine Quantität, die als bedeutungslos angesehen werden kann.

7. Formalin[1]). Zur Anwendung kam der offizinelle Formaldehyd solutus mit 35% Formaldehyd. Um eine Eiweißgerinnung beim Zusatz des Formalins zum Blut zu vermeiden, wurde das Formalin vorher auf das 5 fache, in andern Fällen 10 fache verdünnt.

Die mit 0,5 und 1% Formalin (=0,175 resp. 0,35%

---

[1]) Daß ich das Formalin an dieser Stelle behandelt habe und nicht bei den flüchtigen Substanzen, ist darum geschehen, weil bei der Affinität des Formaldehyds zu Blutbestandteilen, speziell den Eiweißkörpern, an ein Entweichen desselben bei Zubereitung einer Speise keinesfalls zu denken ist.

Formaldehyd) versetzten Blutproben hielten sich mindestens 3 Wochen lang unverändert, abgesehen von einer bräunlichen Verfärbung. Da Formalin bisher für Konservierungszwecke nicht benutzt ist, außer für anatomische Präparate, mußte die Frage, ob das Eiweißkoagulum leicht frei von Formalin zu erhalten ist, besonders sorgfältig geprüft werden.

Zu dem Zweck wurden zunächst 50 ccm des mit 1 % Formalin versetzten Blutes unter Wasserzusatz auskoaguliert, das Koagulum abfiltriert, ausgewaschen und abgepreßt. Eine nicht genau bestimmte Quantität desselben — etwa 8 g — wurde mit 150 ccm Wasser übergossen, 75 ccm abdestilliert, dann wieder 75 ccm Wasser hinzugesetzt und 75 ccm abdestilliert. Beide Destillate gaben die Lebbinsche Reaktion auf Formaldehyd nicht, wohl aber in ausgeprägter Weise meine Modifikation der Leachschen Probe mit Pepton Witte, Eisenchlorid und Salzsäure. Es wurde nochmals destilliert, diesmal unter Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure, das jetzt erhaltene Destillat verhielt sich ebenso. Danach wird also allerdings der Formaldehyd ziemlich energisch festgehalten, indessen darf man sich durch die Farbenreaktionen nicht über die Mengenverhältnisse täuschen lassen. Die Lebbinsche Reaktion fällt nach meinen Wahrnehmungen in einer Lösung von Formaldehyd 1 : 5000 negativ aus, die Leach-Salkowskische[1]) dagegen in 250000 noch ziemlich stark.

Um nun zu einer Vorstellung über die Quantität des zurückgehaltenen Formaldehyds zu gelangen, verfuhr ich folgendermaßen: 50 ccm des 1 % Formalin enthaltenden Blutes wurden wie bisher auskoaguliert, das Koagulum ausgewaschen und abgepreßt. Es wog 40 g. Die Hälfte davon, = 20 g, wurden mit 200 ccm Wasser und 10 ccm verdünnter Schwefelsäure in einen geräumigen Rundkolben gebracht und aus diesem mit Wasserdampf destilliert; starkes Schäumen machte die Anwendung von Paraffin erforderlich. Es ergaben sich 3 Destillate A, B, C zu 1060 bzw. 760 bzw. 300 ccm.

In diesen Destillaten versuchte ich mit je 100 ccm den Formaldehyd bzw. die jodbindende Substanz nach dem Verfahren von Romijn[2]) das ich vielfach an reinen Formaldehyd-

[1]) Ich werde diese im folgenden der Kürze halber als „meine Reaktion" bezeichnen, ohne damit Leach zu nahe treten zu wollen.

[2]) Zeitschr. f. analyt. Chemie 36, 18, 1897.

lösungen als zuverlässig erprobt hatte, zu bestimmen. Zur An wendung kam $^{n}/_{10}$-Jodlösung und eine annähernd entsprechende Thiosulfatlösung, die einige Zeit gestanden hatte. 10 ccm der Jodlösung erforderten in 3 Bestimmungen, die sehr scharf ausfallen, 10,2, 10,2, 10,25 ccm Thiosulfatlösung.

Es zeigte sich nun aber, daß man diese Zahl nicht ohne weiteres benutzen kann. Stellt man nämlich einen blinden Versuch an, genau in der Art der Ausführung zur Bestimmung des Formaldehyds — also: Verdünnen der Jodlösung mit 100 ccm Wasser, Zusatz von Natronlauge, bis zur Gelbfärbung, Stehenlassen während 10 bis 12 Minuten, Ansäuern mit Salzsäure — so zeigte sich, daß man etwas mehr Thiosulfatlösung brauchte, nämlich 10,5 — 10,55 — 10,55 — 10,5 ccm. Worauf diese Differenz beruht, muß einstweilen dahingestellt bleiben, jedenfalls aber darf nur die letztere Zahl als maßgebend angesehen werden.

In keinem der Destillate konnte nach dem Verfahren von Romijn Formaldehyd resp. jodbindende Substanz bestimmt werden bzw. nachgewiesen werden, während A und B meine Farbenreaktion recht ausgeprägt gaben, die Lebbinsche dagegen nicht.

Ich versuchte nun auf dem Wege der Farbenvergleichung die Qantität des Formaldehyds annähernd festzustellen.

Ausgangspunkt war eine Lösung von Formaldehyd von der Konzentration 1:50000, von der 10 ccm zur Anstellung der Reaktion verwendet wurden, die erhaltene Reaktion wurde auf 100 ccm verdünnt. Gleichzeitig wurde die Reaktion mit 10 ccm der Destillate angestellt. Sie war in jedem Destillat bedeutend schwächer, im dritten sehr schwach. Farbengleichheit wurde erreicht beim ersten Destillat, als die Testlösung auf das 5 fache verdünnt wurde, also 10 ccm einer Lösung von 1:250000, beim zweiten Destillat war diese verdünnte Testlösung noch erheblich zu stark, doch ist keine genauere Bestimmung ausgeführt worden. Nehmen wir selbst an, daß das zweite Destillat ebensoviel Formaldehyd enthielt wie das erste, so haben wir 1820 ccm mit einem Gehalt von $\frac{1}{250000} = 7$ mg Formaldehyd, im Koagulum aus 100 ccm Blut also 0,035 g. Das ist eine Quantität, von der eine Gesundheitsschädigung sicher nicht zu befürchten ist[1]).

[1]) Verdünnte Eieralbuminlösungen verlieren nach den Angaben von F. Blum, die ich durchaus bestätigen kann, ihre Gerinnbarkeit, we[illegible]

8. Rohrzucker. Die konservierende Eigenschaft des Rohrzuckers ist von altersher bekannt. Blut, in dem man die gleiche Menge Rohrzucker gelöst hat, bleibt viele Wochen unverändert, allmählich treten Veränderungen ein, wie ich sie in der Zeitschr. f. physiol. Chem. **27**, 316, 1899 beschrieben habe. Inwieweit das Koagulum zuckerfrei zu erhalten ist, habe ich nicht untersucht, da an Herstellung eines solchen unter Aufgabe des Zuckers oder Wiedergewinnung desselben durch Eindampfen im Haushalt doch nicht zu denken ist.

Als Gesamtresultat ergibt sich danach, daß der Vertrieb und die Anwendung durch Borsäure, Salicylsäure und Formalin konservierten Blutes wohl möglich wäre — vorausgesetzt, daß der Konsument sich hieraus das Eiweißkoagulum darstellt — ob das Publikum aber hierzu zu bringen wäre, erscheint mir sehr zweifelhaft. Ein Mittel ausfindig zu machen, das eine direkte Verwendung des damit konservierten Blutes zur Zubereitung von Speisen ermöglicht, ist nicht gelungen. Nach früheren von mir mit Milch angestellten Versuchen[1]) ist dies vielleicht zu erreichen, wenn man zur Konservierung das gasförmige Methylchlorid anwendet. Versuche hierüber mit Blut stehen noch aus.

V. Die Konservierung von auskoaguliertem Bluteiweiß in antiseptischen Flüssigkeiten.

Nicht ganz unerwähnt möchte ich lassen, daß Bluteiweiß, durch Auskoagulieren erhalten, sich in antiseptischen Flüssigkeiten — es wurde Chloroformwasser und $^1/_2\,^0/_0$ Formalinlösung angewendet — sich monatelang, d. h. solange die Beobachtung dauerte, unverändert aufbewahren läßt.

Es fragt sich, ob sich das Chloroform daraus leicht wieder entfernen läßt. Der Versuch ergab folgendes. Das ausgewaschene Koagulum aus 100 ccm Blut wurde 6 Wochen lang unter Chloroformwasser in einem mit Glasstöpsel versehenen Glascylinder aufbewahrt, dann abkoliert, einmal mit Wasser nachgewaschen, mit der Hand abgepreßt. Das Koagulum schmeckte merklich süß

---

man sie mit einigen Tropfen Formalin versetzt (Blum, Zeitschr. f. physiol. Chem. **22**, 127: Über eine neue Klasse von Verbindungen der Eiweißkörper). Das Verhalten des Blutes steht damit in einem gewissen Widerspruch; ich möchte indessen hierauf an dieser Stelle nicht näher eingehen.

[1]) Vgl. Berl. klin. Wochenschr. **1915**, Nr. 23, 597.

und roch nach Chloroform. Es wurde nun mit 250 ccm Wasser bis zum wallenden Sieden erhitzt, nach einigem Abkühlen abfiltriert und abgepreßt. Das jetzt resultierende Eiweiß erwies sich als gänzlich geschmackfrei. Es gelingt also leicht, das Chloroform zu entfernen, bei gehacktem Fleisch, das in Chloroformwasser aufbewahrt wird, ist dies nach früheren Versuchen nicht der Fall, vermutlich weil das Fett Chloroform aufnimmt und festhält.

Nicht so günstig stellt sich die Entfernbarkeit für Formaldehyd. Auch hierzu diente ein 6 Wochen unter $^1/_2$ $^0/_0$ iger Formalinlösung (= 0,175 Formaldehyd) aufbewahrtes Koagulum aus 100 ccm Blut. Das ein wenig gewaschene Koagulum wurde mit 250 ccm Wasser aufgekocht. Der zuerst kolierte, dann filtrierte Auszug gab allerdings keine Lebbinsche Reaktion, wohl aber die Reaktion von Schrywer und meine Reaktion. Das Formalin wird also energischer vom Eiweiß festgehalten, als das Chloroform.

Es erscheint mir nicht gerade vollkommen ausgeschlossen, daß die Haltbarkeit des koagulierten Bluteiweißes in Chloroformwasser praktisch verwertet werden könnte.

VI. Die Herstellung von in toto koaguliertem Blut.

Angesichts der geringen Aussicht, die für die Aufnahme von Blut, sei es konserviertes, sei es nichtkonserviertes, seitens des Publikums besteht, habe ich mir die Frage vorgelegt, ob nicht vielleicht die Herstellung von konserviertem Koagulum Aussicht auf Erfolg bieten möchte. Natürlich ist daran nur zu denken, wenn man das Blut in toto koaguliert, so daß es eine zusammenhängende Masse bildet.

Die Herstellung geschah so, daß das mit dem betreffenden Antisepticum versetzte Blut in einer Blechbüchse mit nicht zu fest schließendem Deckel im Wasserbad resp. Dampfbad so lange erhitzt wurde, bis es fest geronnen war, wozu bei den angewendeten Quantitäten Blut — 100 bis 250 ccm — etwa 1 bis 2 Stunden erforderlich waren. Das geronnene Blut verblieb dann in der Blechbüchse. Durchschnittlich jeden zweiten Tag wurde die allgemeine Beschaffenheit und der Geruch untersucht. Als Ende der Haltbarkeit wurde das Auftreten von Schimmelpilzen angesehen, die sich in allen Fällen zeigten mit Ausnahme der mit 2 $^0/_0$ Formalin hergestellten Präparate. Meistens nahmen die Schimmelpilze an Ausbreitung rasch zu, es trat alkalische Reaktion, Ammoniakbildung und Fäulnis ein.

Die Resultate sind in nachfolgender Tabelle enthalten.

Art des Zusatzes	Prozent-gehalt	Die ersten Schimmelpilzkoionien bemerkt nach der Herstellung
1. Chloroform . . . a)	0,8	am 8. Tage
b)	Überschuß	„ 15. „
2. Borsäure . . . . a)	2,0	„ 12. „
b)	4,0	„ 21. „
3. Formalin . . . . a)	0,5	„ 7. „
b)	1,0	„ 60. „
c)	2,0	bei Abschluß der Beobachtung noch nicht
4. Senföl	Überschuß	am 9. Tage
5. Salicylsäure . . . a)	0,5	„ 9. „
b)	1,0	„ 14. „
6. Toluol	Überschuß	„ 8. „
7. Zucker	100,0	„ 10. „ [1])
8. Zucker mit Zusatz von etwas Kirschsaft . .	100,0	„ 21. „ noch nicht.

Alle konservierten Blutpräparate waren mehr oder weniger fest, am festesten natürlich die mit Formalin hergestellten. Die Färbung war je nach dem Konservierungsmittel etwas wechselnd, bald mehr rötlich, bald mehr bräunlich, am wenigsten unangenehm auffallend bei dem mit Borsäure hergestellten Präparat, das einen rehbraunen Farbenton hat. Sehr haltbar erwies sich eine mit 1 $^0/_0$ Ameisensäure hergestellte Probe, sie ist nicht in die Tabelle aufgenommen worden, weil ihre schwarze Farbe von vornherein jede Anwendungsmöglichkeit ausschließt. Dasselbe gilt für die Essigsäure.

Bezüglich der Möglichkeit, das Konservierungsmittel durch Auskochen der zerriebenen Masse mit Wasser zu entfernen, kann ich auf die bezüglichen Versuche in Abschnitt IV verweisen. Die Entfernung des Formaldehyds gelang aber weniger vollständig. Durch künstlichen Magensaft wurde das formalinhaltige geronnene Blut ebenso leicht verdaut, wie das nichtformalinhaltige.

VII. Fütterungsversuche.

Diese habe ich nur mit formaldehydhaltigen Blutpräparaten ausgeprüft, einerseits weil sich diese am längsten unverändert hielten, andererseits weil Formalin wegen seiner angenommenen Giftigkeit bisher nicht als Konservierungsmittel angewendet worden ist und überhaupt nur wenige Versuche

[1]) In einem anderen Falle war das Präparat nach 6 Wochen noch durchaus genießbar, von saurer Reaktion, trotzdem sich an einer Stelle eine Schimmelkolonie zeigte.

über die Wirkung desselben in verdünntem Zustande und in kleinen Mengen bei innerlicher Anwendung vorliegen.

Die Fütterungsversuche wurden ausnahmsweise an einem äußerst lebhaften männlichen Hund von ca. 12 kg angestellt, da mir eine Hündin zurzeit nicht zur Verfügung stand. Aus diesem Grunde wurde auf eine genaue Sammlung des Harns und Abgrenzung der Perioden verzichtet, der Harn im Käfig aufgefangen. Es handelte sich der Hauptsache nach auch nur um die Beobachtung etwaiger schädlichen Wirkungen des Formaldehyds. Die Versuchsreihe leidet an Unvollkommenheiten, die durch äußere Verhältnisse bedingt sind. Namentlich haben diese bewirkt, daß mir Blut nicht immer in wünschenswerter Menge zur Verfügung stand, die Fütterungsreihe also Unterbrechungen erfuhr. Solche waren aber nicht unzweckmäßig, da der Hund die ungewohnte Nahrung nur ungern aufnahm und zu befürchten war, daß er bei ununterbrochener Anwendung derselben schließlich die Nahrungsaufnahme ganz verweigern würde. Aus den angegebenen Gründen war ich auch genötigt, die Quantität des verfütterten formaldehydhaltigen Materials zu beschränken.

Zuerst erhielt der Hund gewissermaßen zur Probe nach gemischtem Futter mehrere Tage lang als ausschließliches Eiweißmaterial auskoaguliertes Bluteiweiß, das 10 Tage lang unter 1 $^0/_0$iger Formalinlösung gestanden hatte und dann nur abgepreßt war, ohne vorhergehendes Auswaschen, neben etwas Reis und Speck. Der Hund befand sich dabei völlig gut. Es folgte dann 2 Tage Fleischfütterung.

Am 19., 20., 21., 22., 23. März erhielt der Hund täglich 125 g des unter Zusatz von $^1/_2$ $^0/_0$ Formalin in toto koagulierten Blutes mit 30 g Reis und 50 g Speck. Mit dem Blutpräparat nahm der Hund täglich 0,625 g Formalin = 0,219 Formaldehyd auf, also in den 5 Tagen 3,125 Formalin = 1,094 Formaldehyd. Das Futter wurde mit Wasser gekocht, wobei allerdings eine gewisse Quantität Formaldehyd mit den Wasserdämpfen entweichen mußte. Entgegen der vielfach gehegten Vorstellung von der Giftigkeit des Formaldehyds blieb der Hund ganz gesund und ebenso lebhaft wie vorher. Der Kot war spärlich, von schwarzer Farbe, geformt, gelegentlich auch breiig, der Harn war von normaler Farbe, frei von Eiweiß und Zucker. Das Destillat des mit Essigsäure angesäuerten Harns

gab meine Reaktion nur mäßig stark, im Harn selbst war sie nur angedeutet. Die Quantität des ausgeschiedenen Formaldehyds war jedenfalls nur gering.

Es schien mir nun nach verschiedenen Richtungen von Interesse, das Verhalten von der Nahrung zugesetztem Formalin zu untersuchen. Es fragte sich 1. ob es die Verdauung und Ausnutzung der Nahrung stört, 2. ob ein größerer Bruchteil im Harn erscheint, 3. ob es eher eine Giftwirkung entfaltet, als der doch in gewissem Sinne in dem Blutpräparat als gebunden zu betrachtende Formaldehyd.

Die Fütterung begann am 30. März, nachdem der Hund in der Zwischenzeit gemischtes Futter erhalten hatte. Die Nahrung bestand aus 350 g Fleisch, 30 g Reis und 50 g Fett („Palmin") pro Tag. Die Formalindosis wurde etwas größer gewählt in der Absicht, eine etwaige Giftwirkung stärker hervortreten zu lassen. Das Formalin wurde, nachdem es etwa 10fach verdünnt war, dem Futter zugesetzt. Das Futter wurde täglich ganz verzehrt, wenn auch nur zögernd, am 5. Tage fraß der Hund es nur etwa zur Hälfte und der Versuch mußte abgebrochen werden, dasselbe Futter ohne Formalinzusatz jedoch weitergegeben. Der Hund blieb vollständig gesund.

1. Die Ausnutzung der Nahrung. — Eingeführt wurden 1750 g Fleisch = 59,5 N[1]) und 150 g Reis = 1,5 N, zusammen also 61 g N. Hiervon ist der Stickstoff des übrig gelassenen Futters in Abzug zu bringen. Um diesen zu bestimmen, wurde der Futterrest mit einer reichlichen Quantität Kieselgur zusammengerührt, getrocknet und gemahlen. Das Trocknen (auf dem Wasserbad) dauerte außerordentlich lange, war aber doch schließlich zu erreichen, so daß durch Vermahlen ein gleichmäßiges Pulver erhalten wurde. Dasselbe wog 59,1 g, der N-Gehalt desselben ergab sich im Mittel zu 0,96 % = 5,97 g. Somit sind eingeführt 55,03 g N. Der mit Kieselgur abgegrenzte und damit vermischte Kot wog nach dem Trocknen 57 g. Der N-Gehalt war im Mittel 3,54 % = 2,018 g. Danach sind von dem eingeführten N nur 3,67 % nicht ausgenutzt, der Gehalt des Futters an Formaldehyd hat also die Ausnutzung des Fleisches nicht verschlechtert.

[1]) Der N-Gehalt des Fleisches zu 3,4 % gerechnet, um jede zu günstige Annahme zu vermeiden.

2. **Die Ausscheidung des Formaldehyds durch den Harn.** — Der Harn gab, direkt untersucht, die Schrywersche Reaktion nicht, meine Reaktion deutlich, aber nicht besonders stark. Das Destillat — 100 ccm des durch Essigsäure konservierten Harns, davon $^2/_3$ bis $^3/_4$ abdestilliert — gab die Schrywersche Reaktion deutlich, meine meistens ziemlich stark.

Die Feststellung der Quantität des ausgeschiedenen Formaldehyds stieß auf erhebliche Schwierigkeiten, die nicht vollständig überwunden werden konnten. Schon an einer anderen Stelle dieser Mitteilung, sowie an einem anderen Orte[1]) habe ich darauf hingewiesen, daß es schwer hält, den Formaldehyd vollständig in das Destillat zu bekommen, jedenfalls dazu nicht genügt, wenn man etwa $^3/_4$ abdestilliert und die Destillation nach Zusatz einer dem Destillat gleichen Menge Wasser zum Destillationsrückstand wiederholt. Es erwies sich vielmehr notwendig, noch weiter abzudestillieren und außerdem den Harn mit Schwefelsäure anzusäuern.

Das erste Destillat gab regelmäßig bei Zusatz von Jod und Natronlauge Jodoform, das zweite nicht, und es war überhaupt an diesem keine Jodbindung zu konstatieren. Dagegen gab das zweite Destillat noch, bald deutlich, bald nur andeutungsweise, meine Reaktion, namentlich beim Verdünnen der fertigen Probe. Auffallenderweise aber gab es nicht die doch als sehr empfindlich anerkannte Reaktion mit fuchsinschwefliger Säure (Grosse-Bohlesche Lösung). Es ist möglich, daß diese schwache Reaktion nicht von Formaldehyd herrührt, sondern von Oxymethylfurfurol, das die Reaktion mit fuchsinschwefliger Säure nicht gibt und bei Destillation des Harns mit Säure namentlich Mineralsäure, entstehen kann. Andererseits aber darf man in der Deutung meiner Reaktion als positiv auch nicht zu weit gehen, denn wenn man bei einem blinden Versuch (also Wasser, Pepton, Eisenchlorid, Salzsäure) recht energisch kocht, was daher zu vermeiden ist, so zeigt die Probe nach dem Stehen auch eine schwache violette Färbung oder richtiger Nuance und von den Reaktionen auf Oxymethylfurfurol in den betreffenden Destillaten war nur die mit Resorcin + Salzsäure und die mit Sesamöl + Salzsäure andeutungsweise zu erhalten, und auch diese nicht regelmäßig.

[1]) Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 28, 234, 1914.

Eine weitere Schwierigkeit ergab sich für die Anwendung des Romijnschen Verfahrens, des Titrierens mit Jodlösung, dadurch, daß die betreffenden Harne, wie beim Hundeharn ja nicht selten, Thiosulfat enthielten: sie gaben beim Destillieren einen recht merklichen Anflug von Schwefel im Kühlrohr. Der Gehalt des Destillats an schwefliger Säure mußte natürlich das Titrieren mit Jod beeinträchtigen. Es schien mir nun nicht der Mühe lohnend, ein zur Überwindung aller dieser Schwierigkeiten geeignetes Verfahren zu suchen, ich hielt es vielmehr für ausreichend, festzustellen, wieviel Formaldehyd höchstens vorhanden sein konnte.

Zu dem Zwecke verfuhr ich schließlich[1]) folgendermaßen; 100 ccm Harn wurden mit 10 ccm verdünnter Schwefelsäure (200 g Schwefelsäure auf 1 l aufgefüllt) versetzt, dann 90 bis 92 ccm abdestilliert und auf 100 ccm aufgefüllt: Erstes Destillat. Nach dem Erkalten wurden dem Kolbeninhalt 90 bis 92 ccm Wasser hinzugesetzt, wieder 90 bis 92 ccm abdestilliert und auf 100 ccm aufgefüllt: zweites Destillat.

Von dem ersten Destillat dienten 90 ccm zur Bestimmung des Formaldehyds nach Romijn durch Titrieren mit Jod und Natriumthiosulfat. Dabei trat, wie schon bemerkt, regelmäßig Jodoform[2]) auf: das Verfahren bedeutet also nur den Gesamtjodverbrauch. Zur Anwendung kam eine $^{n}/_{10}$-Jodlösung und eine Thiosulfatlösung, von der 10,2 ccm 10 ccm Jodlösung entsprachen. Bei der Bestimmung darf aber, wie bereits erwähnt, nicht diese Zahl zugrunde gelegt werden, sondern die bei einem blinden Versuch erhaltene: es zeigte sich, daß diese höher war, nämlich 10,5. Das zweite Destillat ergab keine Jodbindung, es wurde nicht weniger Thiosulfat verbraucht als im Kontrollversuch. Nachdem dies einigemal konstatiert war, wurde das zweite Destillat bei der Bestimmung nach Romijn nicht mehr berücksichtigt.

Da das Jodverfahren zweifellos zu hohe Zahlen gab, wurde der Gehalt an Formaldehyd auch colorimetrisch bestimmt.

Zum Vergleich diente eine Farbstofflösung, die aus 10 ccm einer

---

[1]) Die beträchtlichen Harnmengen gestatteten eine Reihe von Vorversuchen und Doppelbestimmungen.

[2]) Die Anwesenheit des gelb gefärbten Jodoforms in der mit Thiosulfat zu titrierenden Flüssigkeit erschwerte etwas die Erkennung der sonst überaus scharfen Endreaktion.

Lösung von Formaldehyd 1 : 250000 [1]) nach meinem Verfahren erhalten war und auf 50 bzw. 100 ccm verdünnt wurde.

Diese Farbstofflösung ist, im Dunkeln aufbewahrt, durchaus haltbar, sie wurde indessen ab und zu erneuert. Die angewendeten 10 ccm enthalten $^1/_{40}$ mg Formaldehyd.

Zur Herstellung der Farbstofflösung aus den Destillaten wurde verschieden verfahren. Die restierenden 10 ccm des ersten Destillats wurden zunächst aufbewahrt. Vom zweiten Destillat wurde die Reaktion mit 10 ccm angestellt; ergab sich diese als minimal, so wurde nur das erste Destillat benutzt; schien es dagegen, daß auch das zweite Destillat noch zu berücksichtigen sei, so wurden zu den 10 noch restierenden ccm des ersten Destillats 10 ccm des zweiten hinzugesetzt und von der Mischung 10 ccm zur Anstellung meiner Reaktion benutzt. Dieses zweite Verfahren hat den Nachteil, daß die dünner ausfallenden Farbstofflösungen einen mehr rötlichen Ton haben, der den Vergleich erschwert. Die erhaltenen Farbstofflösungen wurden soweit mit Wasser verdünnt, bis die Intensität der Färbung der einen oder anderen Standardlösung gleich war. Die Vergleichung geschah im 100 ccm-Meßzylinder von annähernd gleichem Durchmesser. Die Resultate sind natürlich nur annähernd, für den vorliegenden Zweck jedoch genügend. Wo eine größere Genauigkeit erwünscht ist, steht nichts im Wege, die erhaltenen unverdünnten, stark sauren Farbstofflösungen mittels des Dubosqschen oder eines ähnlichen Colorimeters zu vergleichen.

Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind in der nachstehenden Tabelle enthalten.

Dat.	Eingeführtes Formalin =	Formaldehyd	Harnmenge in ccm	Jodbindung durch das Destillat: für 100 ccm Harn $^n/_{10}$ ccm-Jodlös.	Jodbindung durch das Destillat: für die Tagesmenge $^n/_{10}$ ccm-Jodlös.	Scheinbarer Formaldehyd mg nach Romijn [2])	Formaldehyd colorimetrisch: mg in 100 ccm	Formaldehyd colorimetrisch: in der Tagesmenge
30. III.	0,65 =	0,228	640	0,90	5,76	8,64 [2])	0,17	1,1
31. III.	1,00	0,350	770	0,90	6,93	10,40	0,27	2,1
1. IV.	1,00	0,350	730	0,85	6,20	9,30	0,24	1,8
2. IV.	0,65 [3])	0,228	700	1,00	7,00	10,50	0,23	1,7
3. IV.	0,65	0,228	540	0,79	4,27	6,40	0,17	0,9
4. IV.	0	0	565	0,79	4,46	6,69	0,16	0,9
5. IV.	0	0	Verlust	0,69	?	?	?	nicht bestimmbar

[1]) Die Richtigkeit der Lösung ist dadurch festgestellt, daß eine Lösung von 1 : 5000 mit Jod und Thiosulfat bestimmt wurde; diese wurde dann weiter verdünnt.

[2]) 1 ccm $^n/_{10}$-Jod = 1,5 mg Formaldehyd.

[3]) Auf 0,65 Formalin wurde wieder zurückgegangen, weil der Hund das Futter augenscheinlich nur widerwillig aufnahm.

Aus der Tabelle ergibt sich nun für die Formaldehydausscheidung folgendes:

Eingeführt sind im ganzen 1,384 Formaldehyd, ausgeschieden nach der Jodmethode 51,93 mg = 3,8 %, die colorimetrische Bestimmung ergibt dagegen nur eine Ausscheidung von 0,61 %, also nur etwa 1/6 soviel. Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß die Jodmethode von Romijn in diesem Falle viel zu hohe Zahlen ergibt, die colorimetrischen Bestimmungen jedenfalls der Wahrheit näher kommen, ja vielleicht auch noch etwas zu hoch sind infolge eines Gehaltes des Destillates an Oxymethylfurfurol. Der Formaldehyd ist also im Organismus des Hundes bis auf ganz geringfügige Reste verschwunden, ohne Zweifel oxydiert.

Mit einigen Worten möchte ich hier noch auf das Verhältnis der zur Formaldehydbestimmung benutzten Methode von Romijn zu der von Messinger für die Acetonbestimmung angegebenen eingehen und zwar namentlich in der von Embden und Schmitz[1]) empfohlenen vereinfachten Form.

Im Prinzip stimmen beide Methoden überein: bei Messinger wird das Destillat zuerst alkalisch gemacht, dann Jod zugesetzt; bei Romijn wird umgekehrt verfahren. Da aber in beiden Fällen die genannten Reagenzien unmittelbar nacheinander angewendet werden, so liegt ein Unterschied in dieser Richtung nicht vor; dagegen ist die Art, wie das Destillat erhalten wird und die weitere Behandlung desselben allerdings verschieden. Bei der Acetonbestimmung vermeidet man starke Säure, um die Einwirkung auf die Kohlenhydrate des Harns und auf Phenolschwefelsäure auszuschließen; ferner wird zu demselben Zweck nicht soweit abdestilliert, endlich wird zur Bindung etwa vorhandener salpetriger Säure das Destillat mit Calciumcarbonat oder Magnesiumcarbonat behandelt und nochmals destilliert[2]). Diese letztere Operation kommt hier nicht in Betracht, da die Destillate keine salpetrige Säure enthalten; es kämen also nur die Kohlenhydrate und das Phenol in Frage.

Es schien mir von Interesse, festzustellen, wie groß der Gehalt des nach Formaldehydzufuhr entleerten Harns an scheinbarem Aceton ist. Dies läßt sich leicht berechnen, indem man von der Gesamtquantität des gebundenen Jods denjenigen An-

---

[1]) Abderhalden, Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden 3, 912.

[2]) Nach der vereinfachten Methode fällt dieses allerdings fort.

teil abzieht, den der Formaldehyd nach der colorimetrischen Bestimmung erfordert[1]). Es ergeben sich so folgende Zahlen:

Datum	Gebundenes Jod in $^n/_{10}$-Jodlösung ccm	Davon auf Formaldehyd zu beziehen ccm	Scheinbares Aceton mg
30. III.	5,76	0,73	5,03
31. III.	6,93	1,40	5,53
1. IV.	6,20	1,20	5,00
2. IV.	7,00	1,13	5,87
3. IV.	4,27	0,60	3,67
4. IV.	4,46	0,60	3,86

Es war von vornherein klar, daß es sich hier nicht um einen besonderen Fall handelte, sondern um eine allgemeine Erscheinung. Leider konnte ich diese Voraussetzung, soweit es Hundeharn betrifft, nur an einem durch Chloroformzusatz konservierten bei Fütterung mit Fleisch und Fett entleerten Harn prüfen. Derselbe wurde so lange gekocht, bis das Chloroform vollständig entfernt war[2]), abgekühlt, auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt (D = 1016) und so wie bisher behandelt. 100 ccm des Destillates[3]) brauchten zur Bindung der in ihm enthaltenen jodbindenden Substanz durchschnittlich 1,5 $^n/_{10}$-Jodlösung, was ungefähr den obigen Werten entspricht. Formaldehyd war in 10 ccm mittels meiner Reaktion nicht nachzuweisen.

Diese jodbindende und jodoformliefernde Substanz ist selbstverständlich nicht Aceton. Das geht schon daraus hervor, daß sie auch aus dem vorher längere Zeit gekochten Harn erhalten wurde. Was ist nun diese jodbindende Substanz bzw. woraus entsteht sie?

Man wird in erster Linie an die jodbindende, jodoformliefernde Substanz denken, die bei der Einwirkung von Mineralsäuren aus Kohlenhydraten entsteht, auf die ich[4]) wohl zuerst aufmerksam gemacht habe mit dem Hinweis, daß dieselbe unter Umständen bei der Bestimmung des Acetons im diabetischen Harn Fehler verursachen könne. Neuberg[5]) hat dann den

[1]) Der Einfachheit halber ist 1 ccm $^n/_{10}$-Jodlösung = 1 mg Aceton gerechnet, andererseits = 1,5 mg Formaldehyd.

[2]) Der Harn reagierte schwach sauer, die Dämpfe alkalisch.

[3]) Aus der Bestimmung von 90 ccm auf 100 ccm umgerechnet.

[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **14**, 476, 1890, und Arch. f. d. ges. Physiol. **56**, 339, 1894.

[5]) C. Neuberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. **27**, 123, 1899.

Gegenstand nach dieser Richtung verfolgt und die Größenanordnung des hierbei und auch bei der Phenolbestimmung etwa zu befürchtenden Fehlers festgestellt, sowie ein Verfahren zur korrekten Phenolbestimmung angegeben; Borchardt[1]) hat die Gesichtspunkte hervorgehoben, die zur Vermeidung dieses Fehlers bei der Acetonbestimmung in Betracht kommen. Nun ist die Annahme sehr naheliegend, daß auch die jodbindende Substanz, die aus mit Säure destilliertem Harn in das Destillat übergeht, Oxymethylfurfurol sei. Im vorliegenden Falle war aber Oxymethylfurfurol durch keine Reaktion sicher nachweisbar, auch meine Reaktion an dem Destillat muß man wohl als negativ bezeichnen. Salpetrige Säure, die Jod bindet, war gleichfalls nicht vorhanden (negativer Ausfall der Grießschen Reaktion mit Metaphenylendiamin und verdünnter Schwefelsäure). Phenol mag in Spuren vorhanden gewesen sein, dafür sprach die deutliche Rosafärbung des Destillates beim Erhitzen mit Millonschem Reagens, während Bromwasser versagte, aber das würde die Jodoformbildung nicht erklären. Dasselbe gilt für Ameisensäure und schweflige Säure. Die Frage nach der Natur der jodoformbildenden, also jodbindenden Substanz in den Destillaten des angesäuerten Harns muß also — für Hundeharn und auch für Menschenharn — einstweilen offen bleiben, indessen habe ich bisher doch feststellen können, daß dieselbe nicht einheitlicher Natur ist. Alkalisiert man das Destillat mit Na_2CO_3 und destilliert aufs neue, so trübt sich das Destillat bei Zusatz von Jodlösung. Es enthält entsprechend der Angabe von Jaffe[2]) Indol[3]), dessen wäßrige Lösung durch Jodlösung getrübt wird unter allmählicher Bildung eines Niederschlages. Dampft man den im Kolben gebliebenen Rückstand völlig zur Trockne, so gibt die Lösung desselben Jodoformreaktion und zeigt, vorsichtig mit Salzsäure angesäuert, schwache Uffelmannsche

[1]) Borchardt, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 8, 62, 1906.

[2]) Jaffe, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol, Supplementband, Festschrift für Schmiedeberg, S. 299, 1908.

[3]) Dampft man menschlichen Harn — etwa 2 Liter — bei durch Natriumcarbonat alkalisch gehaltener Reaktion auf etwa $^1/_{10}$ ein, destilliert nach Ansäuern mit Schwefelsäure, alkalisiert das Destillat mit Na_2CO_3 und destilliert aufs neue, so gibt das nunmehr erhaltene Destillat mit alkoholischer Lösung von Dimethylamidobenzaldehyd (para) und Salzsäure (Ehrlich) eine prächtige Violettfärbung.

Reaktion. Dies deutet auf Milchsäure hin. Das Vorkommen von Milchsäure im nativen Harn wäre augenscheinlich eine Stütze für den von verschiedenen Autoren — namentlich Embden und v. Fürth — in neuerer Zeit angenommenen Ablauf der Oxydation des Zuckers im Organismus über die Milchsäure.

Mit den Angaben in der Literatur, die sich allerdings alle außer einer auf Verbindungen beziehen, die Formaldehyd in ziemlich fester Bindung enthalten, stimmen meine Beobachtungen der minimalen Formaldehydausscheidung durch den Harn zum Teil überein, zum Teil nicht. Ich verweise in dieser Beziehung auf die Arbeit von Abelin[1]), in der die einschlägigen Beobachtungen angeführt sind. Hervorheben möchte ich nur die von Abelin selbst nach intravenöser Injektion von Neosalvarsan (formaldehydsulfoxylsaure Natriumverbindung des Salvarsans) gemachten Befunde. Abelin fand, daß der, am besten $^1/_2$ Stunde, spätestens 3 bis 4 Stunden, nach der Injektion gelassene Harn direkt die Schrywersche Reaktion gibt. Dabei handelt es sich bei Abelin um nicht mehr als etwa 0,07 g mit dem Neosalvarsan eingeführten Formaldehyds beim Menschen, gegenüber den 3- bis 5 mal so großen Dosen bei einem Hunde von 12 kg. Wenn man auch in Betracht zieht, daß die Injektionen in die Venen gemacht wurden und der Harn kurze Zeit danach untersucht wurde, so bleibt die Differenz doch sehr auffallend und läßt den Zweifel aufkommen, ob die Reaktionen bei Abelin nicht doch vielleicht von unzersetzt in den Harn übergegangenem Neosalvarsan herrührten, das ja nach Abelin auch die Schrywersche Reaktion gibt. Abelin spricht sich gegen diese Annahme aus, indessen ist seine Beweisführung, die sich namentlich auf die Widerstandsfähigkeit des betreffenden Harns gegen die ammoniakalische Harngärung stützt, doch nicht ganz überzeugend.

Versuche über den Übergang und namentlich den Umfang des Überganges an freiem in den Magen eingegebenem Formaldehyd in den Harn scheinen nicht ausgeführt zu sein. Nur eine Literaturangabe ist darauf zu beziehen, wenn sie auch nicht in diesem Sinne gedacht ist. Abelin erwähnt in seiner zitierten Arbeit eine dahingehende Angabe von Brugsch, daß nach Darreichung einer Verbindung von Formaldehyd mit Milchzucker

---

[1]) Abelin, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 75, 315.

(0,12 pro die) selbst nach tagelangem Gebrauch kein Formaldehyd im Harn nachzuweisen war, sowie eine vermutlich dasselbe besagende von Rheinboldt. Nach den Untersuchungen von Thoms[1]) handelt es sich bei dieser sogenannten Verbindung von Formaldehyd mit Milchzucker, die im Handel unter dem Namen „Formamint“ geht, nicht um eine Verbindung nach stöchiometrischen Verhältnissen, sondern um ein Gemisch („eine feste Lösung des Formaldehyds in Milchzucker“). Die Versuche von Brugsch sind also tatsächlich als mit freiem Formaldehyd angestellt anzusehen.

3. Was endlich die Giftigkeit des Formaldehyds betrifft, so ist sie früher sicher sehr überschätzt worden, wohl beeinflußt durch die verderbliche Wirkung intravenöser Injektion von Formalin und durch die große Reaktionsfähigkeit des Formaldehyds mit den Eiweißkörpern und diesen nahestehenden Substanzen. Im Gegensatz hierzu konnte Blum[2]) einem großen Kaninchen per os 1,5 Formaldehydlösung (= 0,6 Formaldehyd) ohne dauernde Schädigung geben. P. Rosenberg[3]) verabreichte zwei Kaninchen von 1670 bzw. 1450 g (allerdings im Laufe von $7^1/_2$ bzw. 15 Stunden) 0,48 bzw. 0,76 Formaldehyd in Form einer Verbindung mit Milchzucker[4]), ohne daß Vergiftungserscheinungen eintraten. Fr. Simon (l. c.) gab Kaninchen von 2650 resp. 2100 g 1,0 bzw. 1,5 g des offizinellen Formaldehyd solutus (also 0,35 g resp. 0,52 g Formaldehyd in Wasser auf 50 cm verdünnt) durch die Schlundsonde. Das erste Tier fraß am nächsten Tage sehr wenig, blieb aber sonst ganz munter, das zweite fraß nach der Eingießung nicht mehr, ohne im übrigen ein gestörtes Befinden zu zeigen und wurde (da der Versuch es erforderte) nach 24 Stunden getötet. Ich selbst habe Kaninchen öfters 0,5 g Formalin mit Wasser verdünnt durch die Schlundsonde in den Magen gebracht, ohne danach etwas anderes zu sehen, als daß das Tier am nächsten Tage nicht fraß, wohl aber am zweitnächsten.

Die vorliegenden Versuche sprechen gleichfalls gegen eine

---

[1]) Thoms, Arbeiten aus dem Pharmazeutischen Institut der Universität Berlin **11**, 210 (1914).

[2]) Blum, Münch. med. Wochenschr. **1898**, Nr. 32.

[3]) Rosenberg, Therapie der Gegenwart **1905**, 160; beide Zitate nach Fr. Simon, Diese Zeitschr. **65**, 82, 1914.

[4]) Betreffs dieser „Verbindung“ vgl. die oben gemachten Angaben.

irgend erhebliche Giftigkeit. Angesichts der enormen Dosen Formaldehyd, welche die Tiere ohne Schädigung vertragen, nimmt es wunder, daß die Therapie von diesem mächtigen Desinfektionsmittel für den innerlichen Gebrauch kaum Anwendung gemacht hat, namentlich bei Infektionskrankheiten, die vom Darme ausgehen. Um die unangenehme Wirkung auf „die ersten Wege" zu vermeiden, könnte man ja eine der zahlreichen mehr oder weniger lockeren Verbindungen des Formaldehyds anwenden, aus denen sich leicht Formaldehyd abspaltet. Wünschenswert wäre allerdings, wenn vorher systematische, längere Zeit fortgesetzte Fütterungsversuche mit Formaldehyd an Hunden angestellt würden.

Vermutlich ist an der Scheu vor der innerlichen Anwendung des Formaldehyds die Vorstellung schuld, daß die durchaus noch nicht klare Giftwirkung des Methylalkohols auf durch Oxydation desselben im Organismus entstandenem Formaldehyd beruht, ein Vorgang, den Pohl[1]) für unwahrscheinlich erklärt.

Zusammenfassung.

1. Rinderblut hat sehr annähernd denselben Eiweißgehalt, wie bestes fettfreies Rindfleisch.

2. Der Nährwert des Rinderblutes ist dem des Fleisches gleich.

3. Das Blut läßt sich einige Wochen durch Borsäure, Salicylsäure, Formalin konservieren. Konserviertes Blut ist nicht direkt zur Zubereitung von Speisen verwendbar, wohl aber das hieraus in üblicher Weise dargestellte auskoagulierte Bluteiweiß. Ein Mittel, das eine direkte Verwendung konservierten Blutes zuläßt, ist — abgesehen von starkem Zuckerzusatz — bisher nicht bekannt; vielleicht wäre — nach früheren Versuchen mit Milch — hierzu Methylchlorid (Monochlormethan) geeignet.

4. Auskoaguliertes Bluteiweiß hält sich in Chloroformwasser und $^1/_2{}^0/_0$iger Formalinlösung aufbewahrt, monatelang ganz unverändert. Das anhängende Chloroform ist leicht zu entfernen.

5. Unter Formalinzusatz in toto als zusammenhängende Masse durch Erhitzen koaguliertes Blut hält sich lange Zeit

---

[1]) J. Pohl, Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **31**, 302.

unverändert. Dasselbe gilt von starkem Zuckerzusatz, wenn auch nicht in demselben Umfange.

6. Der Zusatz von 0,6—1 g Formalin täglich zum Futter wurde von einem Hunde von 12 kg gut vertragen, die Ausnutzung des Eiweißes der Nahrung war nicht gestört. Nur ein minimaler Bruchteil des Formaldehyds — etwa 0,6 % — erschien im Harn, alles andere wurde oxydiert.

7. Die Giftigkeit des Formaldehyds bei innerlicher Anwendung ist sehr überschätzt, ausgedehntere Versuche hierüber wären, als Grundlage therapeutischer Verwendung, sehr erwünscht.

8. Destilliert man den Harn von mit Fleisch und Fett oder Fleisch, Fett und Reis gefütterten Hunden weitgehend unter Zusatz von 2 % Schwefelsäure, so gibt das Destillat mit Jodlösung und Natronlauge Jodoformreaktion, dasselbe gilt für menschlichen Harn. Der jodoformliefernde Körper resp. die Muttersubstanz desselben, falls er erst durch Säurewirkung aus einer solchen entstehen sollte, ist unbekannt. Er kann nicht, oder wenigstens nicht immer, Oxymethylfurfurol sein, ein Teil desselben ist vermutlich Milchsäure.

Studien zur Gerinnungsphysiologie.

Einfluß von Alkalien und Säuren. Wirkung einiger Eiweißfällungsmittel. Eine neue Theorie des Gerinnungsvorganges.

Von

E. Herzfeld und R. Klinger.

(Aus dem Chemischen Laboratorium der Medizinischen Klinik und aus dem Hygiene-Institut der Universität Zürich.)

(Eingegangen am 19. Juli 1915.)

Die vorliegende Arbeit gliedert sich einer größeren Reihe von Untersuchungen an, die wir gemeinsam mit Dr. Hirschfeld begonnen haben und die eine systematische Prüfung der die Gerinnung auslösenden oder beeinflussenden Vorgänge nach ihrer chemischen und physikalischen Seite zum Ziele haben. Wir glauben daher, auf die theoretischen Voraussetzungen und auf die technischen Einzelheiten unserer Untersuchungen hier nicht näher eingehen zu müssen, da dieselben an anderer Stelle ausführlich besprochen wurden[1]. Es sei hier nur daran erinnert, daß die Gerinnung des gesamten Blutes ein komplexer Vorgang ist, bei dem schon seit den Untersuchungen A. Schmidts die Thrombinentstehung und die Thrombinwirkung, d. i. die eigentliche Fibrinfällung, unterschieden werden.

Nach dem Beispiele von Bordet und Delange haben auch wir diese beiden Vorgänge bei unseren Studien stets auseinandergehalten und, soweit es möglich ist, getrennt untersucht, was sich für die Analyse der uns beschäftigenden Phänomene sehr vorteilhaft erwiesen hat.

Im folgenden werden Versuche mitgeteilt, die hauptsächlich den Gerinnungsvorgang selbst zum Gegenstande haben und geeignet erscheinen, über das Wesen desselben Aufschlüsse zu geben. Im Anschluß daran soll versucht werden, unter Heranziehung von chemischen Vorstellungen, die der eine von uns

[1]) Technik und Theorie siehe Hirschfeld und Klinger, Zeitschr. f. Immunitätsforschung **1913**, 20; die Technik zum Teil auch in Deutsche med. Wochenschr. **1914**, Nr. 32.

auf anderem Gebiete entwickelt hat[1]), eine Theorie des Gerinnungsvorganges zu geben, die denselben mit anderen Eiweißfällungen in Analogie zu bringen gestattet. Das Wesen des Thrombins und seine Beziehungen zu der Fibrinfällung sollen in einer folgenden Mitteilung erörtert werden.

Zur Versuchstechnik sei erwähnt, daß wir unsere Serozymlösung aus Hammel- oder Ziegen-Oxalatplasma durch Rekalzifieren und Auspressen des Koagulums gewinnen. Zu der an der angegebenen Stelle eingehend beschriebenen Darstellungsweise sei hier bloß nachgetragen, daß sich ein geringer Zusatz 10%iger NaCl-Lösung zur 1%igen Na-Oxalatlösung, in der das Blut aufgefangen wird, als zweckmäßig herausstellte, da das Blut der verwendeten Tiere (namentlich bei häufigeren Blutentziehungen) in reiner 1%iger Oxalatlösung eine geringe Hämolyse erfährt, die die Güte der daraus dargestellten Serozymlösung beeinträchtigen kann.

Als Cytozym wurde, soweit keine besonderen Angaben gemacht sind, der von Merck bezogene alkoholische Meerschweinchenherzextrakt (Syphilisantigen) verwendet, von dem jeweils eine frische Emulsion (0,1 ccm in 4 ccm NaCl-Lösung gespritzt, als $^1/_{40}$ Merck bezeichnet) hergestellt wurde. Als Oxalatplasma wurde nach den früheren Angaben erhaltenes und verdünntes Rinderplasma angewendet.

Um eine richtige Beurteilung der im folgenden ausgeführten Gerinnungszahlen zu ermöglichen, sei daran erinnert, daß Thrombinmenge und Gerinnungszeit einander nicht direkt proportional sind, sondern sich wie die Koordinaten einer Hyperbel entsprechen, wie aus folgendem Versuchsprotokoll ersichtlich ist.

Fallende Mengen einer Thrombinlösung (15′ gestandene Mischung von Serozym 1,0 + Cytozym 0,8 + $NaCl_2$ 10,0 + $CaCl_2$-Lösung 0,4) werden in Röhrchen abgefüllt, jeweils auf 2 ccm Volumen mit NaCl-Lösung aufgefüllt und 1,0 verdünnter Oxalatplasmalösung zugesetzt. Gerinnungszeiten dieses Plasmas mit

Thrombinlösung:	2,0 ccm	2′
	1,5 „	2½′
	1,0 „	3′
	0,8 „	3½′
	0,65 „	4′
	0,5 „	8′
	0,4 „	12′
	0,3 „	25′
	0,2 „	120′ ± (unvollständig geronnen)
	0,1 „	flüssig.

Man sieht, daß die Gerinnungszeiten zuerst nur relativ wenig, plötzlich aber (0,6 ccm) sehr schnell zunehmen, wenn die Thrombinmenge allmählich fällt.

Bedeutung der Salzkonzentration für die Thrombinbildung und Thrombinwirkung (Fällung).

I. Thrombinbildung.

Je 2,0 ccm der folgenden Verdünnungen von NaCl in Wasser + 0,1 ccm Serozym (konz.) + 2 Tropfen Merckextrakt (fallende Dosen) + 1 Tropfen

[1]) E. Herzfeld, Diese Zeitschr. 1915, 70, 262.

$CaCl_2$-Lösung, stehen 15′. Hierauf werden alle Röhrchen durch Zugabe entsprechender Menge von 10% NaCl-Lösung resp. von Wasser auf die Konzentration von 0,9% gebracht und mit 0,9% NaCl auf 2,7 ccm Volumen aufgefüllt. Diese Zusätze müssen in ganz kurzer Zeit geschehen, worauf sofort überall 1,0 ccm Oxalatplasma (verdünnt mit 0,9% NaCl) zugefügt wird. In der letzten Reihe wurde 8%ige Traubenzuckerlösung verwendet, die ebenfalls auf 0,9% NaCl ergänzt wurde. (*N* = netzige Gerinnung.)

Cytozym-Konzentration	Art und Konzentration des Milieus					
	Wasser	0,3% NaCl	0,6% NaCl	0,9% NaCl	1,2% NaCl	8% Zucker
1/80	fl	7½′	3′	6′	180′ *N*	fl
1/160	fl	16′	6′	25′	fl	fl
1/320	fl	180′ *N*	9′	fl	fl	fl

II. Thrombinwirkung.

Jedes Röhrchen erhält zuerst 1,5 ccm der entsprechenden Salzlösung + 1,0 ccm Oxalatplasma, das mit jeweils gleich konzentrierter NaCl-Lösung (unter Zusatz von etwas Oxalat) verdünnt wurde. In einem besonderen Röhrchen wird eine Thrombinlösung hergestellt (Serozym 2,0 + NaCl 6,0 + 1/40 Merck 1,0 + $CaCl_2$ 0,3; 15′ Stehen) und hiervon fallende Mengen (0,7, 0,5, 0,3) in jede Reihe verteilt.

Thrombinmenge	Wasser	0,3% NaCl	0,6% NaCl	0,9% NaCl	1,2% NaCl	8% Zucker
0,7	5′	3′	4½′	11′	120′	10′
0,5	7′	5′	6′	20′	150′	13′
0,3	30′	7′	10′	120′	fl	120′

Es ergibt sich, daß die Thrombinbildung in Abwesenheit von Elektrolyten (Wasser, Zuckerlösung) gar nicht oder nur spurenweise (in anderen Versuchen) nachweisbar ist. Das Optimum liegt bei einer Kochsalzkonzentration von 0,4 bis 0,6%, stärkere Konzentrationen wirken ungünstig. Ganz ähnlich verhält es sich mit dem Fällungsvorgang selbst, für die Gerinnung gelten in bezug auf die optimale Salzkonzentration somit ganz gleiche Bedingungen wie für die Thrombinbildung, eine Übereinstimmung, die gegenüber anderen Momenten keineswegs immer angetroffen wird. Es ist ferner von besonderem Interesse, daß die gewöhnlich als Milieu verwendete physiologische (0,85%) NaCl-Lösung für die Gerinnung in vitro nicht die günstigsten Bedingungen herstellt.

Einfluß des Zusatzes geringer Säure- und Alkalimengen auf die Thrombinbildung und auf die Gerinnung.

In zwei Reihen I und II werden die gleichen Mengen von Serozym, Cytozym und Ca (in gleichem Volumen) zum Zwecke der Throm-

binbildung stehen gelassen. In Reihe I geht diese Thrombinbildung in Anwesenheit von fallenden Mengen der auf ihre Wirkung zu prüfenden Agenzien (Säuren, Alkalien oder Salze, (durchgehend $^1/_{50}$ n-Lösungen) vor sich; in Reihe II erfolgt der Zusatz der entsprechenden Menge dieser Lösungen erst nach 15′, also nach stattgefundener Thrombinentstehung unmittelbar vor Zugabe des Oxalatplasmas. In der Reihe I wird somit schon die Thrombinbildung durch die zu prüfende Substanz beeinflußt, in Reihe II nur der Fällungsakt selbst, die Wirkung des Thrombins.

Von technischen Einzelheiten sei erwähnt, daß eine gemeinsame Serozym-Cytozymmischung (3,0 Serozym + 17,0 phys. NaCl-Lösung + 2,0 $^1/_{40}$ Merck) hergestellt und hiervon in jedes Röhrchen 0,5 ccm gegeben wurde. In Reihe I kamen zuerst die fallenden Mengen (1,0, 0,5, 0,25, 0,1, 0,05) des Agens, die mit NaCl-Lösung auf 1,0 ergänzt wurden, hierauf die Serozym-Cytoxymmischung (0,5) und 1 Tropfen $CaCl_2$; nach 15′ je 0,5 ccm NaCl-Lösung und sofort 1,0 Oxalatplasma. In Reihe II zuerst je 1,0 NaCl-Lösung + 0,5 Serozym-Cytozymmischung + 1 Tropfen $CaCl_2$-Lösung, dann nach 15′ die fallenden Mengen des Agens, die sofort mit NaCl auf 2,0 ccm Gesamtvolumen ergänzt wurden (nur das erste Röhrchen hat 2,5 ccm Flüssigkeit) und 1,0 Oxalatplasma; in beiden Reihen findet die Thrombinbildung und die Gerinnung somit im gleichen Volumen (1,5 resp. 3,0 ccm) statt. (*A* = Agglutination von ausgefallenen Fibrinflocken, keine eigentliche Gerinnung.)

Art des Zusatzes	Reihe I Menge des Zusatzes in %					Reihe II Menge des Zusatzes in %				
	1,0	0,5	0,25	0,1	0,05	1,0	0,5	0,25	0,1	0,03
NaOH . . .	fl	fl	fl	fl	fl	fl	fl	fl	35′	12′
NH_4OH . .	fl	fl	fl	fl	fl	fl	fl	fl	30′	13′
Na_2CO_3 . .	fl	fl	fl	11′	10′	fl	fl	30′	11′	$8^1/_2$′
$NaHCO_3$ . .	2′	2′	3′	5′	5′	4′	4′	5′	6′	$6^1/_2$′
Na_2HPO_4 .	2′	2′	3′	4′	4′	4′	4′	7′	9′	9′
HCl	fl	fl	90′ *N*	fl	fl	fl	150′ *A*	$4^1/_2$′	4′	$5^1/_2$′
H_2SO_4 . . .	fl	fl	90′ *N*	fl	fl	fl	fl	$4^1/_2$′	4′	7′
H_3PO_4 . . .	fl	30′ *N*	120′ *A*	fl	fl	12′ *N*	3′	3′	$3^1/_2$′	5′
Borsäure . .	$1^1/_2$′	2′	3′	5′	$5^1/_2$′	2′	2′	4′	6′	$6^1/_2$′
NaH_2PO_4 .	180′ *N*	180′ *N*	180′	120′	120′	5′	5′	3′	3′	4′
Wasser . .	5′	4′	5′	7′	7′	5′	4′	$4^1/_2$′	$6^1/_2$′	7′
Essigsäure .	fl	fl	80′ *N*	fl	fl	fl	fl	5′	5′	10′
Weinsäure .	fl	fl	fl	80′ *N*	fl	fl	fl	fl	$6^1/_2$′	8′
Oxalsäure .	—	—	—	—	—	fl	fl	5′	10′	25′
Milchsäure .	fl	fl	80′ *N*	fl	fl	fl	80′ *N*	7′	9′	60′
Kontrolle II Wasser . .	—	—	—	—	20′	—	—	—	—	22′

Die Kontrolle für die alkalischen und jene für die anorganischen, sauren Zusätze gab identische Werte und wurde daher nur einmal angeführt. Die vier organischen Säuren wurden in einem besonderen Versuch geprüft und haben deshalb eigene Kontrollen (mit 1,0 phys. NaCl-Lösung angesetzt). Die in jeder Zeile angegebenen Zahlen sind jeweils mit der in derselben Kolonne, aber in der Zeile „Wasser“ stehenden Zahl zu vergleichen, die die Gerinnungszeit ohne den betreffenden Zusatz

(der durch Wasser ersetzt ist) anzeigt. Die in Reihe I bei den sauren Zusätzen verzeichneten späten und unvollständigen (*N*) Gerinnungen waren durch geringe Mengen von Thrombin bedingt, die im Serozym vorhanden waren; sie kamen nämlich auch zustande, wenn kein Cytozym zugesetzt wurde und sind ein weiterer Beweis für die Verstärkung der Fällung durch die saure Reaktion, da ohne Säurezusatz in der cytozymfreien Kontrolle erst nach 18 Stunden schwache Gerinnungen auftraten.

Aus der Tabelle ergibt sich, daß schwach alkalische Reaktion (etwa $^{n}/_{50}$-Bicarbonat) für die Thrombinbildung und auch für die Gerinnung selbst von Vorteil ist, während stärkere Alkalien schon in den kleinsten angewandten Mengen (0,05 ccm $^{n}/_{50}$ auf 1,5 ccm Volumen) hemmend wirken, resp. die Thrombinbildung unmöglich machen. Zusatz stärker dissoziierter Säuren hemmt ebenfalls in den kleinsten Mengen die Thrombinbildung, nur schwache Säuren, die in ihrer Reaktion dem Neutralitätspunkte sehr nahe stehen, wie Borsäure, wirken nicht mehr nachteilig.

In anderen Versuchen mit 1 % Borsäure war bei Zusatz von 0,2 ccm noch deutliche Förderung zu bemerken, während bei 0,4 bis 0,6 ccm schon ein Umschlag in Hemmung eintrat. Ähnlich wie Borsäure wirkt auch Harnsäure, die als gesättigte Lösung ein ganz vorzügliches Milieu für Gerinnungsversuche darstellt. Ob durch diese Säuren die Thrombinentstehung selbst gesteigert wird, kann aus den Versuchen nicht ersehen werden, da, wie Reihe II zeigt, Borsäure auch das fertige Thrombin ganz ähnlich verstärkt; es ist vielmehr wahrscheinlich, daß der Borsäurezusatz für die Thrombinbildung bloß indifferent war, dagegen bei der hierauf folgenden Fibrinfällung begünstigend mitwirkte.

Wirken die Säuren somit auf die Entstehung des Thrombins nur hemmend ein, so liegen die Verhältnisse ganz anders, wenn die Wirkung auf das fertige Thrombin und auf den eigentlichen Gerinnungsvorgang ins Auge gefaßt wird. Das einmal gebildete Thrombin verträgt schwach saure Reaktion sehr gut und wird durch dieselbe in seiner fällenden Wirkung auf das Fibrinogen deutlich verstärkt. Die in der Tabelle angeführten, sowie zahlreiche andere anorganische und organische Säuren gaben, in geeigneter Menge zugesetzt, stets eine Beschleunigung und Verstärkung der Fibrinfällung. Die stärker dissoziierten Säuren wirken hierbei nur in entsprechender Verdünnung fördernd, größere Mengen führen zu sofortigen Eiweißfällungen im Thrombin (Hammelserum) und im Plasma,

die sich als opalescierende Trübung dokumentieren und eine echte Gerinnung verhindern.

Wirkung von Metallsalzen und anderen Eiweißfällungsmitteln auf die Gerinnung.

Nachdem sich ergeben hatte, daß Säuren in geringer Menge (unter der resp. bis zur Grenze der Eiweißfällung) die Thrombinausfällung des Fibrinogens begünstigen, war es von Interesse, auch andere, eiweißfällende Substanzen in dieser Hinsicht zu prüfen. Es zeigte sich, daß die meisten in diese Kategorie gehörenden, von uns untersuchten Stoffe (Metallsalze, verschiedene Alkohole, Körper der Phenolreihe usw.) die Gerinnung günstig beeinflussen.

Wir führen als Beispiel 3 Protokolle an, die diese Wirkung bei Zusatz von Metallsalzen demonstrieren. Im Laufe der hierher gehörigen Versuche haben sich einige Befunde ergeben, die Aufschlüsse über die chemische Natur der Thrombinbildung versprechen, so daß eine nähere Erforschung derselben wünschenswert erschien. Wir werden daher in einer folgenden Arbeit auf dieses Gebiet zurückkommen.

Zu den Protokollen sei noch erwähnt, daß von den Metallsalzen 0,1 $^0/_0$ ige Lösungen verwendet wurden und zwar in fallenden Dosen (mit phys. NaCl auf 1,5 ccm ergänzt); hierzu je 0,3 einer Thrombinlösung und 1,0 Oxalatplasma. In der dritten Versuchsreihe je 1,0 NaCl + 0,6 Fibrinogenlösung + 1 Tropfen Na-Oxalat + 0,3 Thrombinlösung + 0,2 der Salzlösung.

1. (Oxalatplasma.)

Menge der Salzlösung	Zinkchlorid	Bleiacetat	Uranacetat	Mangansulfat	NaCl
0,4	2$^1/_2$′	6′ *N*	6′	12′	180′
0,2	2$^1/_2$′	8′ *N*	20′	18′	—
0,1	3$^1/_2$′	20′	35′	22′	—

2. (Oxalatplasma.)

Menge der Salzlösung	Kupferchlorid	Aluminiumchlorid	Eisenchlorid	NaCl
0,3	2$^1/_2$′	10′	20′ *N*	35′
0,1	3′	12′	35′ *N*	—

3. (Fibrinogenlösung.)

Menge der Salzlösung	Kupferchlorid	Zinkchlorid	Uranacetat	Aluminiumchlorid	Eisenchlorid	Mangansulfat	NaCl
0,2	2′	2′	2$^1/_2$′	3′	3$^1/_2$′	5′	7′

Ohne Thrombin oder bloß mit thrombinfreiem Serozym wurde in den betreffenden oxalathaltigen Plasma- oder Fibrinogenlösungen durch die gleichen Salzdosen höchstens nach Stunden eine flockig-fetzige Fällung beobachtet, meist trat nur ein Niederschlag des ausgefallenen oxalsauren Kalks ohne irgendwelche Gerinnungen auf.

Die Salzwirkung ist bei Verwendung von Oxalatplasma, das an sich viel stabiler ist als reine Fibrinogenlösungen, besonders deutlich, tritt aber auch bei letzteren gut hervor. Die Reihenfolge der Mischung ist für die Intensität, bei manchen Salzen sogar für die Art der Wirkung von wesentlicher Bedeutung; es hängt dies mit der wechselnden Empfindlichkeit des Thrombins (ev. auch des Serozyms) gegen die einzelnen Metallsalze zusammen, wie später gezeigt werden soll.

Die Wirkung der Eiweißfällungsmittel tritt besonders deutlich zutage, wenn der Zusatz derselben nach der Mischung des Thrombins und des Fibrinogens (Plasmas) erfolgt. Wird eine Thrombindosis gewählt, die nicht ausreicht, das Oxalatplasma vor mehreren Stunden zur Gerinnung zu bringen, so bewirkt etwa 10′ später der Zusatz einer geringen Menge von Alkohol, oder einer Lösung eines Schwermetallsalzes eine in wenigen Sekunden ablaufende, typische Gerinnung.

Versuchsbeispiel: In Röhrchen mit je 1,0 verdünntem Oxalatplasma werden fallende Mengen von Thrombin zugesetzt. Das Röhrchen mit der größten Dose (1,0) gerinnt nach 8′, dasjenige mit der um die Hälfte kleineren Dose (0,5) erst nach 3 Stunden. In einem zweiten mit dieser kleineren Thrombinmenge versetzten Röhrchen wird nach 10′ langem Stehen 0,25 ccm 96 °/₀ iger Alkohol hineingespritzt und durch leichtes Schwenken (rasch) vermengt. Unmittelbar bei der Alkoholmischung treten einige fädige Gerinnsel auf, denen nach 10 bis 15 Sekunden die völlige Erstarrung der ganzen Flüssigkeit folgt, während die Kontrolle, wie erwähnt, erst 3 Stunden später gerinnt. Das gleiche läßt sich z. B. mit 1 °/₀₀ $CuSO_4$- oder $FeCl_3$-Lösung hervorrufen. In thrombinfreien Plasmalösungen läßt sich mit denselben Dosen der Eiweißfällungsmittel eine Gerinnung oder irgendeine Fällung nicht hervorrufen. Größere Mengen des Fällungsmittels führen, wie schon oben betont, nie zur Gerinnung, sondern bloß zu einer flockigen Fällung.

Da sich zwischen der Fibrinogenfällung und der chemischen Eiweißfällung (durch die üblichen Eiweißfällungsmittel wie Säuren, Schwermetallsalze usw.) ein gewisser Zusammenhang ergeben hatte, schien es berechtigt, die von E. Herzfeld für die Lösung resp. Fällung von Eiweißkörpern entwickelte Theorie auch auf den

Gerinnungsvorgang zu übertragen und zu prüfen, inwieweit sich dieselbe hier durch experimentelle Ergebnisse stützen ließe.

Theorie des Gerinnungsvorganges.

Auf Grund seiner Untersuchungen kam E. Herzfeld zu der Ansicht, daß nur die durch Hitzekoagulation gewonnenen („denaturierten") Eiweißkörper im strengen Sinne als solche bezeichnet werden können, während die übrigen sogenannten Eiweißkörper Gemische von kolloidalem Eiweiß mit mehr oder weniger von Abbauprodukten desselben darstellen; diesen Beimischungen verdanken sie ihre Wasserlöslichkeit. Werden die Abbauprodukte entfernt, so fallen die Eiweißkörper aus. Am gründlichsten geschieht dies bei der Hitzekoagulation, bei der sich die kolloidalen Eiweißteilchen zu größeren Klumpen zusammenballen und nur sehr wenig Spaltprodukte mitgerissen werden (wobei unter Spaltprodukten Albumosen, Peptone, Polypeptide und Aminosäuren verstanden sind, namentlich solche, die aus dem betreffenden Eiweißmolekül stammen). Zur Auflösung der denaturierten Eiweißkoagula bedarf es zunächst einer partiellen Spaltung, z. B. mit Säure oder Alkali; erst wenn dadurch wieder Abbauprodukte geschaffen werden, ist die Möglichkeit einer Überführung in den kolloidalen Zustand gegeben.

Bei der Dialyse wird dagegen das Eiweiß nicht so gründlich von seinen Spaltprodukten befreit und fällt daher nur teilweise aus; die ausgefallenen Partikelchen haben noch relativ größere Mengen von Spaltprodukten adsorbiert und können daher leicht wieder in Lösung gebracht werden. Ähnliche Verhältnisse, wie bei der Dialyse bestehen bei der Fällung durch Neutralsalze; auch die Fällung mit Schwermetallsalzen und Säuren beruht auf der Entfernung oder besser Umwandlung (Bindung, Salzbildung) der Abbauprodukte, wodurch dieselben ungeeignet werden, die Eiweißmoleküle in Lösung zu halten.

Die gelösten Eiweißkörper unterscheiden sich nach diesen Vorstellungen von den ungelösten durch das Vorhandensein einer entsprechenden Menge von Abbauprodukten. Auf das Gebiet der Gerinnungslehre übertragen, würde diese Theorie verlangen, das Fibrinogen als ein durch Abbauprodukte in Lösung gehaltenes Fibrin und dieses als ein seiner Spaltprodukte beraubtes Fibrinogen zu definieren. Die Gerinnung müßte folglich durch alle Vorgänge oder Substanzen ausgelöst werden, die dem Fibrinogen die zu seiner Lösung unerläßlichen Abbauprodukte entziehen.

Wir möchten im folgenden eine Reihe von Tatsachen anführen, die für eine derartige Auffassung des Gerinnungsvorganges sprechen. Zum Studium der uns beschäftigenden Frage ist es angezeigt, „reine" Fibrinogenlösungen zu verwenden, da

die Verhältnisse im Oxalatplasma weit komplizierter und schwerer beurteilbar sind. Es ist aber selbstverständlich, daß die Theorie auch die Vorgänge, wie sie bei der natürlichen Blutgerinnung sich abspielen, aufzuklären haben wird.

Die Darstellungsweise und die Eigenschaften der reinen Fibrinogenlösungen sprechen bereits in mehrfacher Hinsicht für die Richtigkeit der oben angeführten Annahmen.

Beobachtungen bei der Darstellung von Fibrinogenlösungen.

Nach Reye[1]) werden 100 Teile Plasma mit 40 Teilen Ammonsulfat versetzt, wodurch eine nicht sehr reine Fibrinogenfällung entsteht; wahrscheinlich enthält dieser Niederschlag neben Fibrinogen noch andere Globuline. Weitaus reinere Präparate erhält man, wenn auch in geringerer Ausbeute, nach Hammarsten[2]), wenn man 100 Teile Plasma mit 100 Teilen gesättigter NaCl-Lösung vermischt. Diese Methode haben wir am häufigsten angewandt, wobei Rinderoxalatplasma (scharf zentrifugiert) als Ausgangsmaterial diente. Es war auffallend, daß bei einigen Plasmen auf Zusatz von gleichen Teilen gesättigter Kochsalzlösung keine Fällung auftrat. Erst die Zugabe von verhältnismäßig kleinen Mengen einer gesättigten Ammonsulfatlösung erzeugte einen Fibrinogenniederschlag, der aber noch andere Globuline enthielt. Nach dem Auswaschen dieser Fällung mit gesättigter Kochsalzlösung (Mischen und scharfen Abzentrifugieren) löste sich diese in 5—8 $^0/_0$ NaCl-Lösung gut auf, und diese Lösung gab beim Versetzen mit dem gleichen Volumen einer gesättigten Kochsalzlösung nun sofort eine Fibrinogenabscheidung. Es muß angenommen werden, daß das Plasma Stoffe enthielt, die das Fibrinogen gut in Lösung hielten und eine Fällung durch gesättigte Kochsalzlösung verhinderten, so daß zur Abscheidung noch ein besseres Globulinfällungsmittel, das Ammoniumsulfat, notwendig war, das auch die stabilisierenden Faktoren entfernen konnte. Durch wiederholtes Auflösen des Fibrinogenniederschlages in 5—8 $^0/_0$ NaCl und Fällen mit dem gleichen Volumen einer gesättigten Kochsalzlösung wurde von den, das Fibrinogen in Lösung haltenden Stoffen immer mehr entfernt und so das Fibrinogen stets leichter ausfällbar.

[1]) Reye, Dissert. Straßburg 1898.

[2]) Hammarsten, Arch. f. d. ges. Physiol. 22, 431, 1880.

Wir geben ein Beispiel einer derartigen Verarbeitung eines Plasmas, dessen einzelne, verschieden stabile Fibrinogenfraktionen auch zu einigen (der weiter unten angeführten) Versuche verwendet wurden:

160 ccm Rinderoxalatplasma (frisch, gut zentrifugiert) werden mit 160 ccm gesättigter (kalkfreier) Kochsalzlösung versetzt; es tritt keine Fällung ein. Es werden hierauf noch 20 ccm einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung zugesetzt; reichliche Fällung. Der Niederschlag wird zentrifugiert, dreimal mit gesättigter Kochsalzlösung gemischt und abermals zentrifugiert; der derart gewaschene, gelatinöse Bodensatz mit 140 ccm (da das Volumen des Niederschlages etwa 20 ccm betrug) 2 $^0/_0$ NaCl-Lösung versetzt, worin es sich gut auflöst und durch ein Wattefilter suspensionsfrei gemacht werden kann:

Fibrinogenlösung I. Hiervon wurden 20 ccm für Versuche weggenommen, der Rest (140 ccm) mit 150 ccm gesättigter Kochsalzlösung versetzt, wobei das Fibrinogen nunmehr gut ausfällt (faserig-schleimig), zentrifugiert und dreimal gewaschen, wie oben. Rückstand in 120 ccm 2 $^0/_0$ NaCl gelöst und wiederholt durch Watte filtriert: Fibrinogenlösung II. Hiervon wurden 20 ccm für Versuche weggenommen, der Rest (100 ccm) in gleicher Weise wie I gefällt und gewaschen, schließlich in 100 ccm 2 $^0/_0$ NaCl gelöst: Fibrinogenlösung III.

Stabilität der drei Fibrinogenlösungen: Im Kühlraum (+ 5^0) aufbewahrt, ist Lösung I noch nach 4 Tagen vollständig klar, selbst wenn sie mit Wasser so weit verdünnt wird, daß der NaCl-Gehalt nur noch 1 $^0/_0$ beträgt. Lösung II hält sich gut 2 Tage, ist am 3. Tage teilweise flockig ausgefallen. In 1 $^0/_0$iger Kochsalzlösung bleibt sie durch Stunden flüssig, ist aber am anderen Morgen in toto geronnen. Lösung III fällt schon nach 20 Stunden in 2 $^0/_0$ Kochsalz ziemlich reichlich aus.

Parallel dieser ungleichen Haltbarkeit der einzelnen Lösungen ging auch ihre Fällbarkeit durch Thrombin. So gerann eine auf 1 $^0/_0$ NaCl gebrachte Lösung von Nr. I mit 0,5 ccm einer Thrombinlösung in zwei Stunden, eine ebensolche von Nr. II in 4 bis 5 Minuten, Nr. III in 3 bis 4 Minuten.

Wenn Eiweißabbauprodukte für die Löslichkeit des Fibrins von Bedeutung sind, wie dies die oben entwickelte Theorie fordert, so ist zu erwarten, daß 1. die Entfernung der Abbauprodukte die Stabilität einer Fibrinogenlösung merklich, eventuell bis zur Fällung herabsetzen und daß 2. umgekehrt Zugabe derartiger Substanzen zu Fibrinogen-Lösungen deren Stabilität erhöhen wird. Es wurden diesbezüglich folgende Versuche ausgeführt.

Entfernung von Abbauprodukten durch Dialyse.

Werden an sich stabile Fibrinogenlösungen (in $1^0/_0$ NaCl gelöst) gegen $1^0/_0$ NaCl dialysiert, so tritt in denselben meist schon nach 24 Stunden eine Gerinnung auf, die häufig bis zum geleeartigen Erstarren der ganzen Flüssigkeit führt; hie und da kam es in unseren Versuchen bloß zu flockigen Niederschlägen. Dasselbe läßt sich auch mit verschiedenen Oxalatplasmen (Rind, Mensch) hervorrufen; werden dieselben (thrombinfrei gewonnen) mit dem 1- bis 2 fachen Volumen physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und gegen das 20- bis 40fache Volumen derselben (kalkfreien) Kochsalzlösung (im Kühlraum) dialysiert, so gerinnen sie meistens nach 1 bis 3 Tagen; zuweilen ist mehrmaliger Wechsel der Dialysierflüssigkeit erforderlich.

Auch Pekelharing hat (Zeitschr. f. physiol. Chem., **85**, 341, 1913) ein Versuchsprotokoll mitgeteilt, in dem ein altes Pferdeserum nach Dialyse bessere Thrombinwirkung ausübte, als vorher. Zur Erklärung nimmt er Entfernung „gerinnungswidriger Stoffe“ an, über deren Natur er sich jedoch nicht ausspricht.

Versuche mit Zusätzen von Eiweißabbauprodukten und deren Einfluß auf die Thrombinbildung und Gerinnung.

Von Abbauprodukten wurden einige Peptone untersucht und zwar: Pepton aus Fibrin, Seidenpepton Höchst, Antipepton Grübler, Amphopepton Grübler, ferner ein Peptid Kahlbaum (Leucylglycin). $1^0/_0$ ige Lösungen dieser Peptone wurden in fallenden Mengen in Röhrchen abgefüllt und auf je 1,5 ccm mit physiologischer Kochsalzlösung ergänzt; hierauf wird sofort je 1,0 ccm einer stabilen Fibrinogenlösung (Fraktion I) in $1^0/_0$ NaCl zugesetzt. Gleichzeitig wird in einem besonderen Röhrchen Thrombin vorbereitet (aus Serozym, Merckextrakt und NaCl). Nach 15′ Stehen wird von der letzteren je 0,3 ccm in jedes Röhrchen abgefüllt; die Kontrolle enthielt statt Peptonlösung nur physiologische Kochsalzlösung.

Art des Zusatzes	Menge des Zusatzes			
	0,8	0,5	0,3	0,1
Fibrinpepton	25′ $\underline{+}$	10′ $\underline{+}$	4′	$1^1/_2{}'$
Seidenpepton	10′ $\underline{+}$	$7^1/_2{}'$	$5^1/_2{}'$	$1^1/_2{}'$
Antipepton	12′ $\underline{+}$	8′	3′	$1^1/_2{}'$
Amphopepton	$7^1/_2{}'$	6′	2′	$1^1/_2{}'$
Leucylglycin	$7^1/_2{}'$	5′	$2^1/_2{}'$	$1^1/_2{}'$
Physiol. NaCl	$1^1/_2{}'$	—	—	—

Es ergibt sich, daß die Gerinnung in dem mit Pepton gestandenen Fibrinogen nicht nur deutlich verzögert, sondern auch schwächer, unvollständiger ($\underline{+}$) auftrat als in der Kontrolle. Am stärksten zeigte

sich die gerinnungshemmende Wirkung beim Pepton aus Fibrin. Ähnliche Resultate ergab ein zweiter Versuch mit denselben Lösungen, in dem aber das Thrombin zuerst zum Pepton und erst zum Schluß das Fibrinogen zugesetzt wurde; hierbei waren die beobachteten Gerinnungsunterschiede gegenüber der Kontrolle weniger deutlich ausgesprochen wie im obigen Versuch (Fibrinpepton z. B. 10′, $5^1/_2$′, 2′, 2′, Kontrolle 2′). Die Wirkung der Peptone war somit entschieden deutlicher, wenn dieselben zuerst einige Zeit mit der Fibrinogenlösung in Kontakt gelassen wurden.

In den folgenden Versuchen wurde die Wirkung der Peptonzusätze auf die Thrombinbildung in Oxalatplasma geprüft. Die schon oben verwendeten Peptonlösungen werden in fallender Menge (auf 1,5 mit NaCl ergänzt) mit Serozym und Cytozym und $CaCl_2$ 15′ stehen gelassen und hierauf Oxalatplasma zugesetzt. Im Versuch 1 war die Serozymmenge etwas größer (0,5 ccm 5fach verdünnten Ziegenserozym) als in Versuch 2 (0,3 Serozym).

Art des Zusatzes	Versuch 1 Menge des Zusatzes				Versuch 2 Menge des Zusatzes			
	0,8	0,5	0,3	0,1	0,8	0,5	0,3	0,1
Fibrinpepton .	80′ ±	12′	3′	$1^1/_2$′	fl	fl	14^h	$2^1/_2$′
Seidenpepton .	50′ ±	24′	12′	$1^1/_2$′	fl	14^h ±	14^h	25′
Antipepton .	40′ ±	10′	2′	$1^1/_2$′	fl	fl	14^h	14^h
Amphopepton	6′	3′	2′	$1^1/_2$′	fl	fl	4′	$1^1/_2$
Leucylglycin .	10′	$4^1/_2$′	2′	$1^1/_2$′	fl	fl	10′	$1^1/_2$
Physiol. NaCl	$1^1/_2$′	—	—	—	$1^1/_2$′	—	—	—

Versuch 2 wurde $1^1/_2$ Stunden beobachtet und am folgenden Morgen (14^h) der letzte Befund notiert.

Es zeigt besonders beim Fibrinpepton eine starke Hemmung, die bei Verwendung kleinerer Serozymdosen zum großen Teil in absolute Ungerinnbarkeit überging, während die Kontrolle in $1^1/_2$ Minuten gerann.

Wir haben jedoch nicht immer und mit allen Peptonen Hemmung beobachtet. So ergab eine Lösung von Wittepepton (1 %) in folgendem Versuch entschiedene Beschleunigung der Gerinnung.

1,0 NaCl + 0,1 Serozym + Peptonlösung (fallend und auf 1,0 mit NaCl ergänzt) + 3 Tropfen Merckextrakt $^1/_{40}$ + 1 Tropfen $CaCl_2$, 15′ Stehen, hierauf Oxalatplasma.

Art des Zusatzes	Menge des Zusatzes			
	0,8	0,5	0,3	0,1
Fibrinpepton	25′ ±	25′ ±	8′	5′
Albumosenlösung	18′	8′	$3^1/_2$′	$2^1/_2$′
Wittepepton	$1^1/_2$′	$1^1/_2$′	2′	3′
Physiol. NaCl	5′	—	—	—

Man beobachtet eine wesentlich bessere Thrombinbildung in Anwesenheit von Wittepepton; auch eine Albumosenlösung (1 %) hat in kleinen Dosen deutlich begünstigt, in grösseren gehemmt. Fibrinpepton wirkte auch in diesem Versuch nur hemmend. Wir haben ähnliche, fördernde Wirkung noch in einzelnen anderen Versuchen erhalten, doch war Hemmung die Regel. Es scheint hier die Beschaffenheit des Serozyms, eventuell auch des Oxalatplasmas als ein für die Wirkung dieser Zusätze bedeutungsvoller und keineswegs konstanter Faktor eine Rolle zu spielen.

Die Wirkung der Aminosäuren, Peptide und Albumosen auf die Gerinnung wurde von Zunz und György[1]) in sehr ausgedehnten Untersuchungen studiert. Sie stellten fest, daß kleine Mengen dieser Substanzen häufig fördernd auf die Gerinnung, speziell auf die Thrombildung einwirken, während größere Dosen die Gerinnung hemmen oder ganz verhindern. Auch sie fanden große Unterschiede der für die einzelnen Plasmen optimalen Zusatzmengen. Mit Hetero- und Protoalbumosen beobachteten sie ein eigenartiges Fällungsphänomen, das sie als „Floculoagglutination" bezeichnen und dessen Natur noch nicht geklärt ist (vielleicht mit der Plasteinbildung verwandt?).

Zusatz von Eiweißabbauprodukten zu gerinnenden Flüssigkeiten.

Wir haben nur die relativ stabilen Fibrinogenlösungen, wie sie in den oben mitgeteilten und anderen ähnlichen Versuchen erhalten wurden, mit Peptonlösungen versetzt und deren Einfluß auf die spontane Ausflockung des Fibrins geprüft.

Die Fibrinogenlösungen II und III wurden mit Wasser āā verdünnt und so auf 1 % NaCl gebracht (Lösung II ein Tag alt, Lösung III frisch). Hiervon wurde je 1,5 ccm mit 0,5 ccm der 1 %igen Peptonlösungen versetzt; die Kontrollen wurden mit 0,5 ccm Wasser und (in Rücksicht auf Isotonie) mit ebensoviel einer 0,5 %igen NaCl-Lösung angesetzt. Nach 4 Stunden Stehen konnte folgendes beobachtet werden:

	Lösung II	Lösung III
Wasser	zieml. feste Gerinnung	flockig netzige Gerinnsel
0,5 % NaCl	zieml. feste Gerinnung	flockige Gerinsel
Fibrinpepton	klar	klar
Seidenpepton	zarte Gerinnung	klar
Antipepton	zarte Gerinnung	klar
Amphopepton	klar, an der Oberfläche einige Gerinnsel	klar
Leucylglycin	zarte Gerinnung	klar

[1]) Arch. internat. de Physiol. 14, 4, 1914.

Von einer anderen Fibrinogenlösung werden je 2,0 ccm (1 $^0/_0$ NaCl) mit Wasser resp. mit Fibrinpepton, Wittepepton und miteiner 1 $^0/_{00}$-Hirudinlösung (je 0,5 ccm) versetzt. Die Kontrolle mit Wasser ist am nächsten Morgen geronnen, das mit Wittepepton versetzte Röhrchen zeigt flockige Gerinnsel, die beiden anderen Röhrchen sind flüssig und klar geblieben.

Wir haben also eine Reihe von Versuchsergebnissen mitgeteilt, die zugunsten der von uns gegebenen Theorie des Gerinnungsvorganges sprechen: die Möglichkeit, durch Dialyse (Entfernung von Abbauprodukten) Fibrinogenlösungen und Oxalatplasmen zur spontanen Gerinnung zu bringen; die Tatsache, daß gewisse Eiweißabbauprodukte unter geeigneten Bedingungen (speziell das aus Fibrin hergestellte Pepton) die Thrombingerinnung von Plasmen und Fibrinogenlösungen verzögern oder aufheben und die spontane Gerinnung nicht stabiler Fibrinogenlösungen verhindern.

Wir möchten aber betonen, daß wir durch diese Befunde die aufgestellte Theorie noch nicht als endgültig bewiesen ansehen wollen und geben zu, daß dieselbe noch weiterer experimenteller Nachprüfung bedarf. Wenn auch vorläufig keine Beobachtungen vorliegen dürften, die gegen die Richtigkeit unserer Auffassung sprechen, so bleiben doch einige Tatsachen ungeklärt und bedürfen weiterer Untersuchung.

So wäre zu verlangen, daß die von Zunz und György, sowie auch von uns in einigen unserer Versuche gemachten Befunde, wonach gewisse Eiweißabbauprodukte die Gerinnung nicht nur nicht hemmen, sondern deutlich begünstigen, aufgeklärt würden. Es kann angenommen werden, daß diese Förderung der Thrombinwirkung dadurch zustande kommt, daß die betreffenden Verbindungen (Aminosäuren, Peptone usw.) mit den in der Fibrinogenlösung enthaltenen Abbauprodukten reagieren (mit denselben höhere Komplexe bilden, oder aber sie abbauen) und dieselben dadurch ungeeignet machen, das Fibrin in Lösung zu halten. Es wäre aber auch denkbar, daß sich ihre Wirkung zunächst auf das Thrombin erstreckt und nur indirekt den Fällungsvorgang beeinflußt. Die je nach der Menge bald fördernde, bald hemmende Wirkung vieler hierhergehöriger Stoffe läßt vermuten, daß nicht ein einziger und einheitlicher Vorgang vorliegt, sondern vielleicht beide Möglichkeiten zutreffen.

Von größter Bedeutung wird es namentlich sein, zu untersuchen, ob auch die Thrombinwirkung durch die Theorie in befriedigender Weise aufgeklärt und auf das gleiche Grundphänomen einer Wegnahme (oder Bindung) von Abbauprodukten zurückgeführt werden kann. Es scheint daher unerläßlich, zunächst in dieser Richtung weiter zu forschen und das Wesen dieses eigenartigen Körpers, soweit es möglich sein wird, zu klären.

Solange diese Frage nicht beantwortet ist, möchten wir uns versagen, auf eine Reihe von Erscheinungen einzugehen, die möglicherweise in der aufgestellten Theorie eine Erklärung finden werden, deren nähere Untersuchung nach dieser Richtung hin aber noch aussteht (so die Ungerinnbarkeit des zirkulierenden Blutes und die Gerinnung in vitro, ferner die Autolyse des Koagulums, außerdem die Herabsetzung der Blutgerinnbarkeit nach Peptoninjektion und im anaphylaktischen Shock, das Wesen gewisser Antithrombine, z. B. Hirudin usw.).

Zusammenfassung.

1. Die für die Thrombinbildung optimale Reaktion ist die neutrale oder eine bicarbonatalkalische. Säuren hemmen in kleinsten Dosen.

2. Für die Thrombinwirkung (Fibrinfällung) erwies sich alkalische Reaktion hemmend, Zusatz von Säuren dagegen fördernd.

3. Ähnlich wie Säuren begünstigen auch viele andere Eiweißfällungsmittel die Thrombinwirkung.

4. Es wurde daher versucht, die von E. Herzfeld aufgestellte Theorie der Löslichkeit und Fällung der Eiweißkörper auf den Gerinnungsvorgang zu übertragen. In der Tat ließ sich nachweisen, daß die Lösungsstabilität des Fibrinogens durch gewisse Eiweißabbauprodukte (besonders Fibrinpepton) deutlich beeinflußt wird.

Die Wirkung des Lichtes auf die lebenden Organismen.

Von

Fritz Schanz-Dresden.

(Eingegangen am 29. Juli 1915.)

Das Licht verändert die Struktur der Eiweißkörper in dem Sinne, daß aus leicht löslichen schwerer lösliche werden. Das ist das biologische Grundgesetz über die Wirkung des Lichtes auf die lebende Substanz. Wir wissen jetzt, wie das Licht als Motor eingreift in das Triebwerk alles irdischen Lebens. Wir wissen jetzt auch, daß wir den Gang dieses Triebwerkes beschleunigen und hemmen können. Wir sehen, wie Pigmente der Haut die Lichtwirkung vermindern, und wie sich anderseits durch gewisse Stoffe, die dem Körper eingefügt werden, die Wirkung des Lichtes steigern läßt. Wie wir durch gewisse Stoffe die Lichtwirkung auf die photographische Platte erhöhen können, so können wir auch die Lichtwirkung auf das lebende Gewebe beeinflussen. Das haben uns in erster Linie die Arbeiten von v. Tappeiner und Jodlbauer gelehrt. Hausmann hat sich in einer Untersuchung „Die photodynamische Wirkung des Chlorophylls und ihre Beziehung zur photosynthetischen Assimilation der Pflanze“ mit der photodynamischen Wirkung des Chlorophylls beschäftigt. Er hatte früher[1]) schon gezeigt, daß methylalkoholische Extrakte grüner Pflanzen intensiv photodynamisch auf rote Blutkörperchen wirken. Er versetzte Suspensionen von gewaschenen roten Blutkörperchen mit den methylalkoholischen Auszügen grüner Blätter und bekam in den belichteten Proben Hämolyse, die in den unbelichteten nicht auftrat. Die photodynamische Wirkung grüner Pflanzenauszüge ließ sich unschwer auch mit Paramäcien nachweisen. Im Dunkeln blieben die Paramäcien, wenn sie durch

[1]) Diese Zeitschr. 12, 331.

sorgfältige Neutralisation der Auszüge vor der freien Säure geschützt wurden, am Leben, während sie im Lichte, im Sonnenlicht sowohl wie im hellen diffusen Tageslicht zugrunde gingen. Mit krystallisiertem Chlorophyll (0,05 % Lösung in Methylalkohol) prüfte er jetzt[1]) Paramäcienaufschwemmungen, von denen der eine Teil belichtet, der andere Teil im Dunkel aufbewahrt wurde. Die ersten gingen rasch zugrunde, die im Dunkeln gelassenen Proben zeigten keine Störungen. Dieselben Proben wurden mit Blutkörperchenaufschwemmungen vorgenommen. Nach kurzer Belichtung zeigte sich komplette Hämolyse, während die unbelichteten Proben keine Veränderungen aufwiesen. Phylloporphyrin verhielt sich ähnlich wie das Chlorophyll.

Hausmann suchte danach die Frage zu beantworten, in welchem Zusammenhang diese photodynamische Wirkung des Chlorophylls mit der photosynthetischen Assimilation grüner Pflanzen steht. Er erwähnt, daß zuerst Timiriazeff das Chlorophyll als Sensibilisator im Assimilationsprozeß angesprochen. Engelmann[2]) hat sich dieser Anschauung angeschlossen und das farblose Stroma des Chlorophyllkornes direkt mit der photographischen Platte verglichen und die Wirkung des Chlorophylls mit der der Sensibilisatoren. Hausmann glaubt durch seine Versuche gezeigt zu haben, daß das Chlorophyll nicht nur die Eigenschaft der photographischen Sensibilisation hat, sondern daß es auch die photodynamische Wirkung fluorescierender Substanzen besitzt. Jost hat der photographischen Sensibilisationstheorie entgegengehalten, daß man die Einwirkung des Chlorophylls auf den an sich nicht assimilationsfähigen Chloroplasten nicht mit der Sensibilisierung lichtempfindlicher Platten vergleichen dürfe, da in einem Falle die lichtempfindliche Substanz mit dem lichtunempfindlichen, ungefärbten Chloroplasten verglichen wurde. Auch Hausmann hält es nur für nötig, daß das Chlorophyll als Energieüberträger wirkt. „Ein anderes lichtempfindliches Substrat ist nicht nötig und in der Tat auch nicht vorhanden.“ Er nimmt an, daß das Chlorophyll unter Lichteinwirkung Reizwirkungen ausübt, und daß dieser Reiz, der vom Chlorophyll im Lichte auf den an sich unempfindlichen

---

[1]) Diese Zeitschr. 16, 294.

[2]) Th. W. Engelmann, Farbe und Assimilation. Bot. Zeitg. 1883, 20.

Chloroplasten ausgeübt wird, einen der Hauptmomente für die Anregung der photosynthetischen Assimilation grüner Pflanzen darstellt.

Diese Anschauung ist meiner Ansicht nach jetzt nicht mehr zu halten, wo feststeht, daß die Eiweißkörper und mithin auch der Chloroplast lichtempfindlich sind. Wie ich eingangs erwähnt, wirkt das Licht auf die Struktur der Eiweißkörper in dem Sinne, daß aus leichtlöslichen schwerer lösliche werden. Das lehrten mich meine Untersuchungen an der Augenlinse und am Blut[1]). Ich habe gezeigt, daß durch die Lichteinwirkung auf die Eiweißkörper der Augenlinse diese härter werden und schließlich gerinnen. Dadurch entsteht die Altersweitsichtigkeit und der Altersstar. In den Eiweißkörpern des Blutes erzeugt das Licht ganz gleichartige Veränderungen. An der Augenlinse ließ sich zeigen, daß es Mittel gibt, die, ähnlich wie die Sensibilisatoren auf die photographische Platte, beschleunigend auf die Lichtveränderungen im Linseneiweiß einwirken. Diese Sensibilisatoren sind der Traubenzucker und in weit stärkerem Maße das Aceton. Auch im Blut finden sich solche Sensibilisatoren. Traubenzucker und Aceton wirken auch dort in gleicher Weise. Eosin vermag die Lichtwirkung im Blut ganz besonders intensiv zu steigern. Nicht nur im Reagenzglas! Den Versuch hat in Deutschland schon vor Jahren die Regierung im großen Maßstab durchgeführt. Um die Futtergerste von der Braugerste zu unterscheiden, hatte der Gesetzgeber bestimmt, daß in der Futtergerste etwa jedes 7. Korn mit Eosin leicht angefärbt sein müße. Ein solcher Eosinzusatz war als unbedenklich erklärt worden. Bei den Versuchen, bei denen die Tiere in Ställen gehalten wurden, konnten keine Schädigungen an denselben festgestellt werden. Anders gestaltete sich die Sache in der Praxis. Die Tiere, die solche Gerste gefressen und der Einwirkung des Lichtes ausgesetzt waren, erkrankten unter heftigen Erscheinungen. Es waren keine Eosinschädigungen,

---

[1]) F. Schanz, Die Wirkungen des Lichtes auf die lebende Zelle. Münch. med. Wochenschr. **1915**, Nr. 19. — F. Schanz, Die Wirkungen des Lichtes auf die lebende Substanz. Arch. f. d. ges. Physiol. **161**. — F. Schanz, Sonnenstich-Hitzschlag, Münch. med. Wochenschr. **1915**, Nr. 29.

sondern Lichtwirkungen, die durch das Eosin bis zu schweren Erkrankungen gesteigert wurden.

Ähnliche Lichtschädigungen kennen wir noch bei der Fütterung mit Buchweizen. Die im Winter mit Buchweizen gefütterten Tiere erkranken im Frühling, wenn sie auf die Weide kommen, an schweren Hautentzündungen, während die im Stall gehaltenen Tiere gesund bleiben.

Als Mittel, die die Lichtwirkung auf die Eiweißkörper des Blutes steigern, kommen außer dem oben erwähnten Traubenzucker und Aceton noch andere Stoffe in Frage. Ich habe bis jetzt noch die Milchsäure, den Harnstoff und das Hämatoporphyrin darauf geprüft. Sie haben sich als recht kräftige Sensibilisatoren erwiesen. Bei Strapazen und Hunger wird der Zucker, der in der Leber und in den Muskeln als Glykogen aufgespeichert ist, wieder flüssig gemacht. Es wird nach allen bisherigen Erfahrungen nicht direkt oxydiert, sondern es zerfällt vorher in seine Bausteine, nämlich Traubenzucker. Normalerweise reguliert sich der Zuckergehalt des Blutes, aber bei Strapazen und Hunger werden größere Mengen durch das Blut von den Depots nach den Verbrauchsstellen gebracht. Ist die Person bei den Strapazen der Einwirkung starken Lichtes ausgesetzt, so wirkt der Zucker als Katalysator. In den Muskeln bildet sich bei Arbeit Milchsäure. Bei intensivem Licht wirkt sie in derselben Weise. Unter den Gallenfarbstoffen wird es Substanzen geben, die ebenso wirken. Von Harnstoff und Hämatoporphyrin konnte ich solche Wirkungen feststellen. Es scheint also eine ganze Anzahl solcher Photokatalysatoren in unserem Körper zu geben und mit den Nahrungs- und Genußmitteln führen wir auch noch solche ein. Einer der stärksten ist der Alkohol[1]). Bei starker Arbeit und mangelhafter Nahrungszufuhr wird die Bildung solcher Stoffe im Körper gesteigert, in Unkenntnis ihrer Gefahr werden sie wohl auch in erhöhtem Maße dem Körper zugeführt. Es ist gar nicht ausgeschlossen, daß es unter solchen Umständen zum Zerfall von Hämoglobin und zur Bildung von Hämatoporphyrin, einem der kräftigsten Photokatalysatoren, kommt. Wir sehen

[1]) F. Schanz, Sonnenstich-Hitzschlag. Münch. med. Wochenschr. 1915, Nr. 29, S. 979.

dann bei intensiven Lichtwirkungen die Reaktion nicht im Blute selbst, sondern in den empfindlichen Apparaten des Körpers, mit denen das Blut in Berührung kommt. Es kommt zu den Erscheinungen des Sonnenstiches und Hitzschlages.

Wir haben hier sehr intensive photokatalytische Prozesse. Sehr ernste Schädigungen unserer Gesundheit! Das sind die extremsten Wirkungen. Auf denselben Prozeß sind aber auch die wohltätigen Wirkungen des Lichtes auf unseren Körper zu beziehen. Bei dem Genuß des Sonnenlichtes wirken alle diese Faktoren mit und erzeugen das Wohlbehagen, das wir bei Sonnenschein empfinden, die Kräftigung, die wir bei Reisen ins Gebirge und an die See erleben, hängt zum Teil mit dieser Lichtwirkung zusammen.

Wie steht es mit dem Lichtgenuß der Pflanzen? Der Chloroplast ist nicht, wie man jetzt annimmt, lichtunempfindlich. Das Eiweiß des Chloroplasts ist mit aller Wahrscheinlichkeit wie die übrigen Eiweißkörper lichtempfindlich. Das Chlorophyll wirkt darauf als Katalysator. Die photokatalytische Wirkung des Chlorophylls auf die Blutkörperchen und die Paramäcien ist, wie schon eingangs erwähnt, von Hausmann festgestellt. Ich habe sie auf das Serumeiweiß folgendermaßen geprüft: 1 g Chlorophyllösung des Handels wurden mit 100 g physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. $^1/_4$, 4 und 10 ccm dieser Lösung wurden 50 ccm Serumeiweiß zugesetzt und die ersten 2 Kölbchen mit physiologischer Kochsalzlösung auf 60 ccm aufgefüllt. Diese Kölbchen wurden auf das Dach gestellt, der gleiche Versuch ins Dunkle. Nach 2 Tagen wurden die Proben untersucht und verglichen. Aus jedem Kölbchen wurden 10 ccm Lösung herauspipettiert und in Reagensröhrchen gefüllt. Jedem Reagensröhrchen wurden zunächst 2 ccm gesättigte Kochsalzlösung zugesetzt, dann wurde jedem Röhrchen mit einer feinen Pipette 0,01 ccm stark verdünnte Essigsäure so lange zugesetzt, bis sich in den ersten Röhrchen hauchartige Trübungen zeigten. Man wartet dann am besten ab, die Niederschläge nehmen ohne jedes Zutun allmählich zu. Man erhält schließlich folgendes Bild: In den belichteten Röhrchen tritt ziemlich gleichzeitig der Niederschlag auf, die unbelichteten Röhrchen zeigen bei gleichem Essigsäurezusatz noch nicht die geringste Trübung, während die belichteten sich schon sehr intensiv getrübt haben,

und diese Trübungen nehmen zu entsprechend dem Gehalt an Chlorophyll. Es wurde die Probe zum Vergleich auch mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung ausgeführt. Es wurde den Proben zuerst 5 ccm dieser Lösung zugesetzt und dann gleichmäßig 1 ccm, bis die ersten Trübungen sich zeigten. Das Ergebnis war dasselbe.

Der Versuch lehrt also, daß das Chlorophyll auch auf das Serumeiweiß als mächtiger Katalysator wirkt. Wo bei so viel Eiweißarten diese Wirkung feststeht, dürfte man auch berechtigt sein, für die Eiweißkörper des Chloroplasten dieselbe Wirkung anzunehmen. Das Licht wirkt auf die Struktur der Eiweißstoffe der Pflanzen in dem Sinne, daß aus leichtlöslichen schwerer lösliche werden. Im Pflanzenkörper gibt es, wie vor allem durch die Arbeiten von C. Neuberg erwiesen ist, zahlreiche, besonders anorganische Stoffe, die auf die organischen Substanzen der Pflanzen als Photokatalysatoren wirken. Dem Chlorophyll kommt keiner gleich. Wir haben hier den großartigsten photokatalytischen Vorgang in der Natur.

Im Aufbau und beim Stoffwechsel im pflanzlichen wie im tierischen Organismus spielen die anorganischen Stoffe eine große Rolle. Neuberg hat erwiesen[1]), daß nahezu alle organischen Stoffe eine ausgesprochene Sensibilität erlangen, wenn sie mit bestimmten anorganischen Stoffen gemischt sind. Während praktisch die in den Pflanzen vorkommenden Säuren keinerlei Lichtempfindlichkeit zeigen, erwerben sie eine solche in sehr ausgesprochener Weise, wenn sie in Gegenwart bestimmter mineralischer oder organischer Katalysatoren von den Sonnenstrahlen getroffen werden. Als solche Katalysatoren, welche die Lichtenergie übertragen, sind Eisen-, Mangan-, Arsen-, Uran-, Quecksilbersalze einerseits, bestimmte organische Chromophore (Anthracenderivate) andererseits zu nennen. Bringt man nach den Angaben von Neuberg und Peterson[2]) z. B. Milchsäurelösung in Gegenwart einer Spur Eisensalz in das Sonnenlicht, so entweicht Kohlensäure und es entsteht Acetaldehyd, dabei vermindert sich natürlich die Acidität. Ganz ähnlich ist der Abbau der Weinsäure, der Citronensäure, der

---

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 13, 305, 1908; 29, 279, 1910; 61, 315, 1914.

[2]) C. Neuberg und W. H. Peterson, diese Zeitschr. 67, 63, 1914.

Apfelsäure, der Bernsteinsäure und anderer organischer Säuren, wenn sie in Gegenwart des Katalysators und von Luft der Einwirkung des Lichtes ausgesetzt sind. Stets erfolgt eine charakteristische Molekülverkleinerung unter Entbindung von Kohlensäure, wobei fast immer weniger saure Substanzen gebildet werden.

Als Photokatalysatoren sind Eisen- und Mangansalze weit verbreitet, geringe Spuren genügen, um katalytische Prozesse zu veranlassen. Auch Uran-, Arsen-, Quecksilbersalze werden von Neuberg als Katalysatoren bezeichnet. Mir lag jetzt daran, mich über die Wirkung der Mineralsalze als Photokatalysatoren auf die Eiweißkörper zu orientieren. Ich hielt es deshalb für angebracht, in der Natur vorkommende Mineralsalzlösungen auf diese Wirkung zu prüfen. Ich verwandte zu diesem Versuch eine Anzahl Mineralwässer. Der Versuch wurde folgendermaßen ausgeführt:

Blutserum wurde 20fach mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, durch Berkefeldfilter filtriert. In 20 Erlenmeyersche Kölbchen wurden je 50 ccm dieser Eiweißlösung gebracht. In je 2 dieser Kölbchen wurden 10 ccm destilliertes Wasser und dann in je 2 derselben ebensoviel von den zu untersuchenden Mineralwässern gebracht. Die Mineralwässer waren, um ihnen die Kohlensäure zu entziehen und um sie zu sterilisieren, vorher einige Zeit erhitzt worden. Es wurde bei der Erhitzung darauf geachtet, daß kein Niederschlag auftrat. Die eine Hälfte der Kölbchen wurde auf das Dach, die Vergleichskölbchen ins Dunkle gestellt. Von Anfang an ist möglichst steril gearbeitet worden, und am Ende der Belichtung erwiesen sich alle Kölbchen steril. Der Versuch wurde in gleicher Weise 2 mal, das eine Mal mit 2 tägiger, das andere Mal mit 4 tägiger Belichtung ausgeführt, beide Versuche führten zu gleichem Ergebnis.

Der Vergleich der Proben wurde folgendermaßen vorgenommen: Aus jedem Kölbchen wurden 10 ccm herauspipettiert in Reagensröhrchen, die belichtete Probe neben der entsprechenden unbelichteten. Jedem Reagensröhrchen wurden zunächst 2 ccm gesättigte Kochsalzlösung zugesetzt und dann mit einer feinen Pipette der Reihe nach 0,01 ccm stark verdünnte Essigsäure. In allen belichteten Röhrchen trat der Niederschlag

eher auf als in den unbelichteten, doch zeigen die belichteten Röhrchen unter sich sehr erhebliche Abweichungen. Am ehesten und intensivsten kam die Trübung in dem Röhrchen, in dem der Eiweißlösung 10 ccm destilliertes Wasser zugesetzt war. Bei den Proben mit den Mineralwässern kam die Trübung später und erreichte auch nicht dieselbe Dichte. Die Reihenfolge nach der Intensität der Trübung war in beiden Versuchen:

Dürkheimer Maxquelle (arsenhaltig), Oberharzer Sauerbrunnen Wilder Mann, Tassiloquelle (arsenhaltig), Tölzer Jodtrinkquelle, Elsterer Moritzquelle (eisenhaltig), Pyrmonter Stahlquelle, Karlsbader Mühlbrunnen, Elsterer Salzquelle, Dunaris.

Der Versuch zeigt also, daß es unter den Mineralsalzen Stoffe gibt, welche die Lichtwirkung auf die Eiweißkörper verlangsamen, am ausgesprochensten war dies bei dem Dunariswasser. Wir haben hier negative Photokatalysatoren, während das Chlorophyll, Hämatoporphyrin, Phylloporphyrin, Traubenzucker, Aceton, Milchsäure, Harnstoff als positive Photokatalysatoren anzusehen sind. Es bedarf weiterer systematischer Untersuchungen, um die Photokatalysatoren für die Pflanzen zu ermitteln, vor allem wird die Prüfung der Stoffe, die sich in den Düngemitteln finden, unsere Kenntnisse in dieser Frage fördern.

Für mich kommt es jetzt nur darauf an, zu zeigen, daß bei dem Lichtgenuß der Pflanzen photokatalytische Vorgänge von größter Wichtigkeit sind, die organischen Salze des Pflanzenkörpers erleiden durch das Licht katalytische Veränderungen, aber auch die Eiweißkörper werden durch das Licht direkt verändert, ihre Veränderungen werden durch die Photokatalysatoren, die der Pflanze aus dem Nährboden zugehen, oder die sich im Organismus selbst bilden, beschleunigt und gehemmt.

Für den tierischen Organismus werden die Verhältnisse im Grunde dieselben sein. Mit unseren Nahrungsmitteln führen wir Photokatalysatoren (Alkohol, Chlorophyll, Traubenzucker usw.) ein. Im Organismus bilden sich solche (Traubenzucker, Milchsäure, Harnstoff, Aceton, Hämatoporphyrin). Die obigen Versuche zeigen uns, daß wir positive und negative Photokatalysatoren besitzen und damit die Lichtwirkung auf unseren Kör-

per dosieren können. Neuberg hat in seinem Vortrag: Beziehungen des Lebens zum Licht[1]) schon auf diese Bedeutung der Mineralwässer aufmerksam gemacht und darauf hingewiesen, daß jede Brunnen- und Badekur sowie jede klimatische Behandlung, bei „Licht besehen", eine Lichttherapie ist. Ich bin derselben Ansicht. Wir lernen hier einen neuen Heilfaktor kennen, der meiner Ansicht nach die höchste Beachtung verdient.

---

[1]) C. Neuberg, Monogr. Berlin 1913, Allgem. Medizin. Verlagsanstalt.

Eine einfache Methode zur quantitativen Bestimmung sehr geringer Kaliummengen.

Von

H. J. Hamburger in Groningen.

(Eingegangen am 30. Juli 1915.)

Inhalt.

I. Einleitung.

Es gibt eine Anzahl Fragen auf physiologischem und klinischem Gebiete, deren Beantwortung nur möglich ist, wenn man über ein genaues Verfahren zur quantitativen Bestimmung geringer Kaliummengen verfügt. Ist ja deren Prozentgehalt in organischen Flüssigkeiten bekanntlich sehr klein.

Diese Überlegung drang sich mir auf, als ich die Bewegung von Kalium zwischen Blutkörperchen und natürlicher Umgebung unter verschiedenen physiologischen Bedingungen studieren wollte.

Bis jetzt sind für die Kaliumbestimmung zwei Methoden gebräuchlich; sie sind gewichtsanalytischer Natur. Die älteste ist die, nach der man aus der Asche alle Metalle, ausschließlich Natrium, entfernt und das Kalium mittels Platinchlorid abscheidet. Diese Methode ist umständlich, kostspielig und nicht zuverlässig. In seiner beachtenswerten Arbeit äußert sich Einar Biilmann[1]) bezüglich dieser Methode folgendermaßen: „Die Empfindlichkeit hängt im wesentlichen von der Menge der gleichzeitig anwesenden Natriumsalze ab, und zwar so, daß sie sich ziemlich schnell verringert, wenn die Menge der letzteren vergrößert wird. Ganz abgesehen von solchen Methoden, die gar nicht den Nachweis kleiner Mengen Kalium gestatten, wird selbst die Anwendung von Wasserstoffplatinchlorid recht problematisch und auch recht kostspielig, wenn es sich darum dreht, eine Spur eines Kaliumsalzes in einem Natriumsalze zu ermitteln. Schon die umständlichen Operationen, die eine exakte Ausführung dieser Reaktion erfordert, schließen ja in der Tat ihre Anwendung in diesem Falle aus."

Eine große Verbesserung brachte die Anwendung des noch wenig beachteten de Koninckschen Kobaltreagenses (Natriumkobaltinitrit), wodurch das Kalium in Gegenwart mancher Metallsalze als Kaliumnatriumkobaltinitrit niedergeschlagen

---

[1]) Einar Biilmann, Zeitschr. f. anal. Chem. **39**, 284, 1900.

wird. Man hat dieses Verfahren bis jetzt nur für Seewasser (van Leent) und für Harn (Autenrieth und Bernheim) angewandt.

Leider besitzen die betreffenden gelben Krystalle nach den Untersuchungen von Gilbert keine konstante Zusammensetzung, so daß es nicht möglich ist, aus dem Gewicht der gelben Krystallmasse die Kaliummenge abzuleiten. Die genannten Autoren haben deshalb nach Gilberts Vorschlag diese Reaktion nur benutzt, um aus dem gelben Präcipitat und zwar durch Zersetzung, das Kalium als Nitrat abzuscheiden und nach Umwandlung in KCl, mittels $PtCl_4$ oder $HClO_4$ niederzuschlagen und zu wägen.

Der Vorteil, den dieser über das Kobaltreagens gehende Umweg liefert, ist darin gelegen, daß man aus großen Flüssigkeitsmengen, die nur wenig Kalium enthalten, letzteres in konzentrierter Form abscheidet.

Indessen handelt es sich, es sei denn daß man das K als K_2PtCl_6 oder als $KClO_4$ abscheidet, um Gewichtsanalysen, die, wenn es kleine Mengen gilt, keine große Genauigkeit zulassen. Jedenfalls soll man also möglichst beträchtliche Mengen nehmen.

Wählen wir ein Beispiel: Bunge[1]) nahm für die Bestimmung des Kaliums in Hundeblutserum 45,7 g Serum und erhielt daraus nur 0,0479 g K_2PtCl_6 [2]). Um 45,7 g Serum zu bereiten, braucht man wenigstens 120 g Blut. Um einen Doppelversuch anstellen zu können, was ja immer sehr wünschenswert ist, braucht man also 240 ccm Blut. Von mehreren solchen Blutentziehungen, die z. B. mit einigen Stunden Zwischenraum aufeinander folgen und notwendig sind, um den Einfluß von Eingriffen in vivo auf die Zusammensetzung zu studieren, kann nicht die Rede sein, selbst wenn es sich um einen großen Hund handelt; denn auch der Einfluß der Blutentziehung als solche wird sich hier geltend machen können. Noch mehr fallen diese Beschwerden bei Kaninchen und auch beim Menschen ins Gewicht.

---

[1]) Bunge, Zeitschr. f. Biol. 12, 204, 1876.

[2]) Es entspricht das 0,0136 g $KClO_4$. Aus verschiedenen Gründen zieht man es gegenwärtig vor, das Kalium in dieser Form zu bestimmen und zu wägen.

Handelt es sich also um die Frage, ob gewisse innerhalb der physiologischen Grenzen sich bewegende Einflüsse eine kleine Zu- oder Abnahme des Kaliumgehalts herbeiführen, so stößt man auf den Mangel an einer Methode, die sich mit einer geringeren Menge zufriedenstellen kann.

Wir glauben diesen Mangel ausgefüllt zu haben, indem es uns gelungen ist, in 5 ccm Serum oder 1 ccm Blut den Kaliumgehalt zu ermitteln, und zwar bis zu einer Fehlergrenze, die auch weit unter der der jetzt gebräuchlichen $KClO_4$-Methode[1]) liegt.

Das Verfahren beruht auf der Volumbestimmung des durch Kobaltreagens (Natriumkobaltinitrit) erzeugten krystallinischen Niederschlages von Kaliumnatriumkobaltinitrit, das wir weiter nach Gilbert mit dem Namen „Kobaltgelb" bezeichnen werden.

II. Einige Bemerkungen über die Anwendung der Zentrifugalkraft zu quantitativ chemischen Zwecken.

Die Anwendung der Zentrifugalkraft zu biologisch-volumetrischen Zwecken datiert schon vom Jahre 1890, als Hedin[2]) mittels eines dafür konstruierten, graduierten Capillarrohrs, dem er den Namen Hämatokrit beilegte, das Volum der Blutkörperchen im Blut maß nach Vermischung mit Müllerscher Flüssigkeit (Kaliumbichromat).

Danach habe ich[3]) die Zentrifugalkraft benutzt um den Einfluß des osmotischen Drucks auf das Volum der roten Blutkörperchen zu untersuchen, und andere[4]) (Gryns[5]), C. Eykman[6]), Hedin[7]), Koeppe[8]) usw.) sind gefolgt.

---

[1]) S. Anmerk. 2 S. 417.

[2]) Hedin, Skandinav. Arch. f. Physiol. 2, 134, 360, 1890.

[3]) H. J. Hamburger, Centralbl. f. Physiol., 17. Juni 1893.

[4]) Es haben sich darüber unrichtige Angaben in die Literatur eingeschlichen, die ich in einer in diesem Zeitschriftheft abgedruckten Notiz richtigstellen werde.

[5]) Gryns, Zittingsverlag Koninkl. Akad. v. Wetenschappen te Amsterdam, 24. Febr. 1894.

[6]) C. Eykman, Onderzoekingen in het laboratorium voor pathologische anatomie en bacteriologie te Weltevreden over het jaar 1894; dasselbe in Arch. f. d. ges. Physiol. 60, 340, 1895.

[7]) Hedin, Skandinav. Arch. f. Physiol. 5, 207, 238, 1895; Arch, f. d. ges. Phys. 60, 360, 1895.

[8]) Koeppe, Arch. f. d. ges. Physiol. 60, 154, 1895.

Später benutzten wir die Zentrifugalkraft auch für die Volumbestimmung anderer tierischer Zellen[1]).

Auch wies Verfasser bei Gelegenheit des internationalen Physiologen-Kongresses[2]) in Heidelberg 1907 auf den Nutzen der Anwendung der Zentrifugalkraft für volumetrisch-chemische Zwecke hin. Er faßte die Vorteile der Volumbestimmung zu quantitativ chemischen Zwecken folgenderweise zusammen:

1. Sie gibt ein Mittel an die Hand, um bei verschiedenen Temperaturen Gleichgewichtsreaktionen in heterogenen Systemen zu verfolgen, deren Studium bis jetzt unmöglich war.

2. Bei Körperflüssigkeiten ereignet es sich nicht selten, daß Stoffe, die man durch Gewichtsanalyse quantitativ zu bestimmen pflegt, in so geringen Mengen vorhanden sind, daß man ein zuverlässiges Resultat nicht erwarten darf, da der mögliche prozentische Fehler zu bedeutend ist. In solchen Fällen kann das Verfahren mit Erfolg benutzt werden.

3. Auch in Fällen, daß eine größere Menge an Material zur Verfügung steht, gewährt die Methode noch den Vorteil, daß man den Niederschlag niemals auszuwaschen, einzuäschern und mehrmals zu wägen braucht, was insbesondere für Serien von Versuchen sehr zeitraubend ist.

4. Dürfte auch aus rein physikalisch-chemischen Gesichtspunkten eine bequeme, zuverlässige Bestimmung des Verhältnisses zwischen Volum und Gewicht von Präcipitaten Interesse beanspruchen.

Bereits ein Jahr zuvor hatte die Methode vorzügliche Dienste bei der Bestimmung der Gleichgewichtsreaktion zwischen Präcipitin und Antipräcipitin geleistet[3]).

Trotz der soeben genannten Vorteile hat bis jetzt die Volumbestimmung zu quantitativ-chemischen Zwecken wenig Anwendung gefunden. Ich glaube, daß die Ursache haupt-

---

[1]) Hamburger, du Bois-Reymonds Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1898; vgl. auch Osmotischer Druck und Ionenlehre 3, S. 1.

[2]) Hamburger, Die Anwendung der Zentrifugalkraft im physiologischen Laboratorium (mit Demonstration). Sonderabdruck des betreffenden Resümees, Heidelberg 13. bis 16. August 1907.

[3]) H. J. Hamburger und Svante Arrhenius, On the nature of precipitin-reaction. Proceedings of the kon. Akademie v. Wetenschappen te Amsterdam, 27. April 1906.

sächlich darin gelegen hat, daß die Größe der den Niederschlag bildenden Teilchen dessen Volumen zu sehr beeinflusst, sowohl wenn das Präcipitat amorph, wie wenn es krystallinisch ist.

Es ist somit von großer Wichtigkeit, die Bedingungen ausfindig zu machen, unter denen die mittlere Teilchengröße in allen Versuchen dieselbe ist.

Das, und auch die ungenauen bzw. fehlerhaften Angaben über die Bedingungen einer vollständigen Ausscheidung des Kaliums sind die vornehmsten Ursachen gewesen, daß die Ausarbeitung unserer Methode Monate an Arbeit gekostet hat. Zuweilen schien es, als ob wir unseren Plan aufgeben müßten und wir gingen zu einer anderen Methode über, nämlich zur Bestimmung des Volums des krystallinischen $KClO_4$. Als aber auch hier die Resultate nicht befriedigend waren, kehrten wir wieder zum Kobaltreagens zurück.

Welchen Schwierigkeiten man begegnen kann, wenn man Gewichtsanalysen durch Volumbestimmungen ersetzen will, geht wohl aus der Zeit und Mühe hervor, die Strzyzowski[1]) sich hat geben müssen, um die Menge des Harneiweißes aus dessen Volum zu ermitteln. Es zeigte sich, daß das von ihm erhaltene Eiweißvolum von der Tourenzahl des Apparates, von dem Radius der Zentrifuge, von der Zeit des Zentrifugierens und von der Temperatur abhängt. Um diesen Bedingungen genau gerecht zu werden, ist es erforderlich, daß jede Maschine mit einem Präzisionstachymeter und mit einem Zeitmesser mit Signal ausgestattet ist, während auch die Temperatur, bei der zentrifugiert wird, einen nicht unbedeutenden Einfluß auf das Volumen des Sedimentes ausübt[2]).

Diese Anforderungen stellt meine Kaliumbestimmungsmethode nicht. Das Volum des Kobaltgelbs ist nach kurzdauerndem Zentrifugieren konstant geworden und ist weiter unabhängig von der Zeit des Zentrifugierens. Die Tourenzahl

---

[1]) C. Strzyzowski, Sur un vœu relatif au perfectionnement des centrifugeurs destinés aux recherches quantitatives biochimiques. IX[e] Congrès International des Physiologistes. Groningue 2 à 6 septembre 1913. Résumé des Communications et Démonstrations. (Reçu le 24 juin 1913.)

[2]) Derselbe, Zeitschr. f. physiol. Chem. 88, 25, 1913.

hat keinen anderen Einfluß, als daß das konstante Volum bei Vergrößerung der Geschwindigkeit und des Zentrifugenradius schneller erreicht ist. Um die Temperatur des Zimmers hat man sich nicht zu kümmern.

Wir rechnen uns das nicht als ein Verdienst an. Nur kann man sagen, daß bei Einhaltung gewisser Kautelen die Volumbestimmung mittels der Zentrifuge viel besser für die Kaliumbestimmung mittels Kobaltreagens, als für die quantitative Bestimmung des Eiweißes geeignet ist.

III. Bedingungen für eine vollständige und für die volumetrische Bestimmung brauchbare Kaliumabscheidung.

Wenn man die Arbeiten der Autoren studiert, die sich mit der Abscheidung von K mittels Kobaltreagenses befaßt haben, so bekommt man den Eindruck, als ob für die vollständige Abscheidung des Kaliums die Konzentration des Kobaltreagenses ohne Bedeutung ist. Ohne Motivierung gebraucht der eine schwache Konzentrationen, der andere starke. Doch hat sich aus unseren vielfachen Versuchen herausgestellt, daß man die Konzentration des Kobaltsalzes in der Mischung von Reagens und zu untersuchender Flüssigkeit keineswegs außer Betracht lassen darf, daß sie vielmehr von hervorragender Bedeutung ist, wenn man eine vollständige Kaliumabscheidung zu erzielen wünscht.

Vielleicht ist es für diejenigen, die sich später mit dem Problem beschäftigen wollen, nützlich, die Angaben der verschiedenen Methoden in einer übersichtlichen Zusammenstellung vor sich zu haben. Außerdem wird dieselbe unsere Besprechungen erleichtern.

Zu umstehender Zusammenstellung möchten wir hinzufügen, daß Macallum[1]) noch ein etwas anderes Reagens gebraucht hat. Er benutzte es aber nicht zur quantitativen Bestimmung des Kaliums, sondern zum mikroskopischen Nachweis des Metalles in Zellen und Geweben. Es wurde bereitet durch Vermischung von 5 g Kobaltnitrit, 8,75 g Natriumnitrit, 2,5 ccm Eisessig und 22,5 ccm Wasser und enthielt also etwa 20 % Kobaltsalz.

---

[1]) Macallum, Journ. of Physiol. 32, 198, 1904 bis 1905.

Autoren und Publikationsstelle	Zusammensetzung des Reagenses	Prozentgehalt des Reagenses an Kobaltsalz	Temperatur und Zeit der Einwirkung	Prozentgehalt der Mischung (Kobaltreagens + zu untersuchende Flüssigkeit) an Kobaltsalz
1. De Koninck: Zeitschr. f. anal. Chem. **20**, 390, 1881.	Keine genaue Angabe. Man findet die aber bei Biilmann (Zeitschr. f. anal. Chem. **39**, 284, 1900). 5 g kryst. Kobaltchlorür + 10 g $NaNO_2$ in 100 ccm Wasser.	± 5 % kryst. Kobaltchlorür.	Wird nicht mitgeteilt.	
2. Gilbert: Dissertation, Tübingen 1898.	5 g Kobaltacetat + 12,5 ccm Essigsäure von 1,04 spez. Gewicht, verdünnt mit Wasser zu 250 ccm. Diese Lösung wird versetzt mit 250 ccm $NaNO_2$-Lösung, die 45 g $NaNO_2$ enthält.	± 1 % kryst. Kobaltacetat.	Während einer Nacht bei 40°. Nach Zusatz von 1 ccm Essigsäure von 30 %; und dem Erkalten verarbeitet.	25 ccm 4 % ige KCl-Lösung + 300 ccm Reagens von 1 % = 0,92 % Kobaltacetat.
3. Biilmann: Zeitschr. f. anal. Chem. **39**, 284, 1900.	5 g Natriumkobaltidnitrit $Co(NO_2)_3\,3(NaNO_2)$ in 30 ccm Wasser (ohne Essigsäure).	± 16 % kryst. Natrium-Kobaltidnitrit $CoNa_3(NO_2)_6$.	„In der Kälte."	0,025 ccm 0,74 % ige KCl-Lösung + 10 ccm Wasser + „einige Tropfen" Reagens (16 % ige Natriumkobaltidnitritlösung).
4. van Leent: Zeitschr. f. anal. Chem. **40**, 569, 1901.	Mischung wie bei Gilbert, aber statt Kobaltacetat die entsprechende Menge, d. h. 4,79 g Kobaltchlorür.	± 1 % kryst. Kobaltchlorür.	7 Stunden bei 40 bis 50° und dann eine Nacht in der Kälte.	0,3 g KCl in 70 ccm Wasser + 130 ccm Reagens = 0,65 % Kobaltchlorür.
5. Autenrieth u. Bernheim: Zeitschr. f. physiol. Chem. **37**, 29, 1902.	(Nach Angabe von Erdmann, Anorgan. Chemie 1898, 630) 5 g kryst. Kobaltnitrat gelöst in 10 ccm Wasser. Diese Lösung wird vermischt mit einer Lösung von 8,3 g $NaNO_2$ + 1,6 ccm Essigsäure + 26,6 ccm Wasser. „Die so erhaltene 15 fache Normallösung kann zum Verbrauch verdünnt werden." (Die Autoren setzen es aber in unverdünntem Zustande zum Harn hinzu.)	± 20 % kryst. Kobaltnitrat.	Temperatur nicht erwähnt. Einwirkungsdauer 6 bis 8 Stunden oder eine Nacht.	50 ccm Harn (die eine K-Menge enthielt, die 0,224 g KCl entsprach) + 6 bis 10 ccm Reagens = 2,14 % bis 3,3 % Kobaltnitrat. Bei den zwei Versuchen zur Kontrolle der Kobaltmethode wird von der Wassermenge, in der das KCl aufgelöst war, nicht gesprochen, ebensowenig über das Volum des hinzugefügten Reagenses.

A. Kontrollversuche betreffs Angaben bei anderen Autoren.

a) Angaben von Biilmann.

Wie ersichtlich, gehen die Angaben der Autoren ziemlich weit auseinander. Aber wie gesagt, vermißt man die Motivierung dazu. Das würde aber nicht von praktischer Bedeutung sein, wenn in der Tat die Angaben zu befriedigenden Resultaten führten. Das war aber mit keiner der Fall. Wir werden das durch einige der von uns angestellten Kontrollversuche nachweisen.

Für eine Kontrolle kam eigentlich die Biilmannsche Angabe kaum in Betracht. Denn zunächst hat er die Reaktion lediglich zum Nachweis von Kalium angewandt und also nicht zur quantitativen Bestimmung. Demzufolge hat er bloß die Empfindlichkeit der Reaktion untersucht. Diese aber ist auch für die quantitative Bestimmung von Bedeutung, so daß seine Untersuchungen uns auch hier interessieren. Dazu kommt, daß er in Abweichung von anderen ein Reagens angewandt hat, das man fertig kaufen kann. Es ist Natriumkobaltinitrit, ein orangegelbes Salz. Wir haben viele Versuche damit angestellt, mit dem Zweck, es für unsere Methode anzuwenden. Bald aber stellte es sich heraus, daß Biilmanns Angaben für uns zu ungenau waren. Statt genau anzugeben, wieviel Reagens er gebraucht, spricht dieser Autor bloß von Hinzufügung von „einigen Tropfen Reagens“. So versetzt er, um die Empfindlichkeit der Reaktion zu prüfen, 0,025 ccm KCl-Lösung von 0,74 $^0/_0$ nach Vermischung mit 10 ccm Wasser, mit „einigen Tropfen“ seines Reagenses und konstatiert dann einen Niederschlag. Wir konnten das nicht bestätigen, selbst wenn **10** Tropfen hinzugefügt wurden. Wir vermißten eine Fällung sogar, wenn statt 0,025 ccm KCl von 0,74 $^0/_0$ = **0,000185** g KCl, 0,1 ccm von 0,6 $^0/_0$, also **0,0006** g KCl, d. h. mehr als die 3 fache Menge KCl, in 10,1 ccm Wasser verteilt, gebraucht wurde. Selbstverständlich wurden nach Angabe des Verfassers alle Mischungen lange Zeit in der Kälte (+ 2 ^{0} C) gelassen.

Auch sah man das gelbe Präcipitat nicht auftreten, wenn 0,0006 g KCl, statt in 10,1 in 1,6 ccm Wasser, aufgelöst war. In dieser Flüssigkeit entstand es aber unmittelbar, wenn statt „einiger Tropfen“, 0,5 ccm des 20 $^0/_0$ igen Reagenses hinzugefügt wurden.

b) Angaben von Gilbert, van Leent und von Autenrieth und Bernheim.

Wir kommen auf die Anwendbarkeit von Biilmanns Reagens für unsern Zweck noch zurück. Gilbert, van Leent und Autenrieth und Bernheim haben im Gegensatz zu Biilmann die Reaktion zu quantitativen Zwecken studiert, speziell Gilbert. Dieser Verfasser hat ausführliche Untersuchungen über die Reaktion angestellt, um die Zusammensetzung des Kobaltgelbs ausfindig zu machen[1]). Wir haben bereits erwähnt, daß dieselbe nicht konstant gefunden wurde. Die Formel lautet $Co(NO_2)_3 \cdot 3\,(K/NaNO_2) + n\,H_2O$, in der die relative K- und Na-Menge wechselt mit der in der Flüssigkeit vorhandenen Na-Menge. Auch die Anzahl Krystallwasser-Moleküle ist nicht konstant. Selbstverständlich geht Gilbert von der Meinung aus, daß er durch Vermischung der von ihm gebrauchten Kaliumlösungen mit seinem Reagens in den von ihm erwähnten Verhältnissen, das K quantitativ fällt. Bei wiederholten Versuchen fanden wir aber, daß seine Mutterlaugen nach Zusatz von starkem Reagens noch eine nicht zu vernachlässigende Kaliummenge enthalten.

Dieser Befund kann nicht wundernehmen, wenn man sieht, daß die Kobaltgelbmengen, die er aus gleichen Volumina derselben Kaliumsalzlösung erhielt, Unterschiede von sogar 10% und mehr zeigen, obgleich er für seine Analysen große Quantitäten Kalium (1 g Chlorkalium) genommen hat (S. 17 l. c.). Wie dem auch sei, er hat das abgeschiedene Kobaltgelb getrocknet und gewogen, und nach Zersetzung durch Hitze das K und Na ausgezogen und quantitativ bestimmt.

Van Leent hat das Kobaltreagens benutzt um das Kalium aus Seewasser abzuscheiden um dann (ebenso wie Gilbert) durch Zersetzung des Kobaltgelbs das Kalium in konzentriertem Zustande zu bekommen und bestimmen zu können. Um die Zuverlässigkeit der Methode zu prüfen, hat er ein paar K-Bestimmungen in bekannten KCl-Lösungen ausgeführt. Auch bei Einhaltung der von van Leent angegebenen Verhältnisse

[1]) K. Gilbert, Die Bestimmung des Kaliums nach quantitativer Abscheidung desselben als Kaliumnatriumkobaltinitrit. Inaug.-Dissert. Tübingen 1898

(vgl. die tabellarische Zusammenstellung) ließ die Abscheidung des Kaliums an Vollständigkeit zu wünschen übrig; denn nach weiterer Zugabe von Reagens bildete sich noch neues Kobaltgelb.

Nach diesen qualitativen Versuchen haben wir auch quantitative gemacht und dabei, insoweit es möglich war, auch noch nach den Angaben von Autenrieth und Bernheim gearbeitet. Wir sagen, „insoweit es möglich war", denn wie aus der Übersichtstabelle hervorgeht, haben die Autoren nicht angegeben, in welchen Verdünnungen sie die zur Kontrolle dienende KCl-Lösung und das Reagens gebrauchten; und wie wir unten nachweisen werden, ist das für die Erzielung zuverlässiger Resultate von der größten Bedeutung. Wir haben die Verhältnisse gewählt, wie diese von ihnen für Harn genommen wurden.

Um unsere quantitativen Kontrollversuche beschreiben zu können, müssen wir mit einigen Worten auf die Besprechung unserer eigenen Methode im voraus Bezug nehmen. Wie erwähnt, scheiden wir das Kalium als Kobaltgelb ab und bestimmen das Volum der mikroskopisch feinen krystallinischen Masse, und zwar in trichterförmigen Röhrchen, deren geschlossenes, kalibriertes capillares Ende 0,04 ccm Inhalt besitzt und in 100 Teile geteilt ist (vgl. S. 451).

Wir bemerken noch, daß wenn die Präcipitatmenge während des Versuches sich größer erwies als 0,04 ccm (100 Teilstriche), noch ein zweites Röhrchen benutzt wurde.

Die folgende Tabelle bringt eine Wiederholung der Versuche von Gilbert, van Leent und Autenrieth und Bernheim unter sehr genauer Einhaltung ihrer Angaben, nicht nur von der Zusammensetzung und der Quantität der von ihnen gebrauchten Kobaltreagentia, sondern auch von der Konzentration der von ihnen angewandten KCl-Lösung. (Man vergleiche hierzu die tabellarische Zusammenstellung.) Nur wird hier nicht, wie bei den genannten Autoren das gebildete Kobaltgelb zersetzt, um daraus das Kalium abzuscheiden und quantitativ zu bestimmen, sondern einfach das Volum des Kobaltgelbes ermittelt. In allen Versuchen ist, um die Vergleichung zu erleichtern, dieselbe KCl-Menge, d. h. 0,025 g gebraucht.

Aus Tabelle I, S. 426, geht hervor, daß nach dem Verfahren von van Leent 0,025 g KCl in beiden Parallelversuchen 117 Verteilungen Kobaltgelb lieferten; das Gilbertsche Ver-

Tabelle I.

Die Unvollständigkeit der Kaliumfällung bei Einhaltung der Angaben von Gilbert, van Leent und Autenrieth u. Bernheim.

Lösungen:	Die 0,025 g KCl enthaltenden Lösungen liefern an Kobaltgelb:
1. 0,62 ccm einer 4 % igen KCl-Lösung + 4,8 ccm des Reagenses nach Gilbert	111 Teilstriche
1a. Dasselbe Gemisch wie unter 1. (Also Parallelversuch)	114 „
2. 5,8 ccm einer KCl-Lösung, die 0,3 g KCl in 70 ccm Wasser enthielt + 11 ccm des Reagenses nach van Leent	117 „
2a. Dasselbe Gemisch wie unter 2	117 „
3. 5 ccm einer KCl-Lösung von 0,5 % + 0,6 ccm des Reagenses nach Autenrieth und Bernheim	85 „
3a. Dasselbe Gemisch wie unter 3	87 „

Tabelle II.

Vollständige Fällung des Kaliums bei Anwendung von mehr Reagens.

Lösungen:	Die 0,025 g KCl enthaltenden Lösungen liefern an Kobaltgelb:
1. 0,62 ccm einer 4 % igen KCl-Lösung + 4,8 ccm des Reagenses nach Gilbert	114 Teilstriche
1a. 0,62 ccm einer 4 % igen KCl-Lösung + **10** ccm des Reagenses nach Gilbert	**130** „
2. 5,8 ccm einer KCl-Lösung, die 0,3 g KCl in 70 ccm Wasser enthält + 11 ccm des Reagenses nach van Leent	117 „
2a. 5,8 ccm einer KCl-Lösung, die 0,3 g KCl in 70 ccm Wasser enthält + **25** ccm des Reagenses nach van Leent	**129** „
3. 5 ccm einer KCl-Lösung von 0,5 % + 0,6 ccm des Reagenses nach Autenrieth und Bernheim	87 „
3a. 5 ccm einer KCl-Lösung von 0,5 % + 2 ccm des Reagenses nach Autenrieth und Bernheim	**129** „

fahren lieferte etwas weniger (111 und 114); das Autenrieth-Bernheimsche Verfahren noch weniger (85 und 87).

Es lag nun auf der Hand, anzunehmen, daß wenigstens durch das Autenrieth-Bernheimsche Verfahren nicht alles Kalium gefällt wurde. Das war in der Tat auch nicht der Fall; denn es stellte sich heraus, daß Zusatz von mehr Reagens zu

der klaren Flüssigkeit noch neues Kobaltgelb zur Abscheidung brachte. Dasselbe war aber in geringerem Maße der Fall bei den Versuchen nach der Gilbertschen und auch nach den van Leentschen Angaben.

Wir untersuchten nun weiter, ob bei Zugabe von viel mehr Reagens, als die Autoren angeben, übereinstimmende Resultate zu erreichen sein würden. Das wurde in der Tat gefunden, wie aus Tabelle II hervorgeht. In dieser Tabelle sind außerdem Versuche mit der in der Tabelle I gebrauchten Reagensmenge aufgenommen worden.

Man sieht, daß die jetzt erhaltenen Zahlen: 130, 129 und 129 schön miteinander übereinstimmen. Aber wieviel mehr Reagens haben wir denn auch nicht hinzugefügt als die Autoren angeben!

Auch stellte es sich heraus, daß bei Anwendung der betreffenden größeren Reagensmengen (1a, 2a, 3a) die von den Präcipitaten entfernten klaren Flüssigkeiten bei weiterem Zusatz von Kobaltlösung vollkommen klar blieben.

Nachdem es sich also herausgestellt hatte, daß durch Anwendung einer genügenden Menge der drei Kobaltreagentia nicht nur eine vollständige Fällung des Kaliums, sondern auch übereinstimmende Zahlen zu erhalten waren, untersuchten wir ob eine Verdünnung der KCl-Lösung mit Wasser das Volum des Kobaltgelbes beeinflussen würde. Leider war das der Fall. Mit der Zugabe von Wasser nahm, was die Autoren nicht berücksichtigt haben, das Volum des Niederschlages stetig ab.

B. Einfluß der Kobaltkonzentration des Gemisches auf die Abscheidung des Kobaltgelbes.

Nach vielen vergeblichen Versuchen sind wir zu der Überzeugung gelangt, daß, um eine vollständige Fällung des Kaliums zu erzielen, die **Kobaltkonzentration des Gemisches** von Flüssigkeit und Reagens nicht hinter einem gewissen Prozentgehalt zurückbleiben darf.

Aber auch einen allzu hohen Prozentgehalt an Kobalt im betreffenden Gemisch soll man vermeiden. Freilich wird dann alles Kalium gefällt, aber die mikroskopisch feine krystallinische Masse sintert dann zu groben Partikeln zu-

sammen, und weil darin in verschiedenen Experimenten Unregelmäßigkeit besteht, zeigen sogar Parallelversuche bedeutende Volumdifferenzen.

Die letzte Spalte der übersichtlichen Zusammenstellung (S. 422) zeigt, daß die Autoren sich des Einflusses der Wasserverdünnung auf die Vollständigkeit der Fällung nicht bewußt waren. Bei Gilbert ist die betreffende Konzentration des Kobaltsalzes 0,92 %, bei van Leent 0,65 %, bei Autenrieth-Bernheim 2,14 % bis 3,3 %; die letzten Autoren erlauben nachdrücklich eine willkürliche Verdünnung. Wir werden auf diese Sache nicht weiter eingehen, aber wollen nur erwähnen, daß es nach unserer Erfahrung zweckmäßig ist, dem Gemisch von Flüssigkeit und Kobaltreagens eine Konzentration von etwa **3,9 %** kryst. Kobaltsalz (wir gebrauchten Nitrat) zu geben.

Wir gebrauchen auf 5 ccm mit etwas Essigsäure angesäuerter kaliumhaltiger Flüssigkeit 1,5 ccm unseres Reagenses. War mehr Flüssigkeit vorhanden, so wurde eingeengt (vgl. für die Bereitung unseres Reagenses S. 453 und für die Vorbereitung der zu untersuchenden Flüssigkeit für die K-Bestimmung S. 459).

Ob in diesen 5 ccm Flüssigkeit wenig oder viel Kalium vorhanden ist, ist ohne Bedeutung. Natürlich darf nicht so viel vorhanden sein, daß 1,5 ccm Reagens nicht genügen. Ist das der Fall, so verdünnt man die 5 ccm zu 10 ccm und setzt statt 1,5 ccm 3 ccm Reagens zu. Es bleibt dann die Konzentration des Kobaltsalzes in der Mischung doch 3,9 %.

Wir geben nunmehr einen Versuch wieder, um den Einfluß der Wasserverdünnung zu zeigen.

Aus Tabelle III geht deutlich hervor, daß das Volum des niedergeschlagenen Kobaltgelbs desto geringer wird, je mehr man die KCl-Lösung verdünnt hat.

Wahrscheinlich wird man sofort die Frage erheben, ob dann das Verhältnis in den Versuchen a und a′ das Richtige getroffen hat. Das ist in der Tat der Fall, wie später nachgewiesen werden wird. Außerdem können wir bereits hier sagen, daß in den Mutterlaugen von b und b′, c und c′, d und d′ bei weiterem Zusatz von Reagens eine neue Fällung entstand, keine Spur dagegen in der Mutterlauge von a und a′.

Tabelle III.

Einfluß einer zu geringen Kobaltsalzkonzentration im Gemisch.

Flüssigkeiten:	Volum des Kobaltgelbs
a 5 ccm KCl-Lösung von 0,36 % + 1,5 ccm unseres Reagenses	91
a' Parallelversuch von a	91
b 5 ccm KCl-Lösung von 0,36 % + **5 ccm H_2O** + 1,5 ccm unseres Reagenses	82
b' Parallelversuch von b	82
c 5 ccm KCl-Lösung von 0,36 % + **10 ccm H_2O** + 1,5 ccm unseres Reagenses	73
c' Parallelversuch von c	73
d 5 ccm KCl-Lösung von 0,36 % + **20 ccm H_2O** + 1,5 ccm unseres Reagenses	58
d' Parallelversuch von d	57

Wir sagten soeben, daß man nicht allzuviel Reagens nehmen darf, weil dann die Volumbestimmung zu wünschen übrig läßt. Wir geben ein Beispiel, um das zu verdeutlichen.

Tabelle IV.

Einfluß einer allzu großen Kobaltsalzkonzentration.

Flüssigkeiten:	Volum des Kobaltgelbs
a 5 ccm KCl-Lösung von 0,36 % + **1,5 ccm** unseres Reagenses	91
a' Parallelversuch von a	91
b 5 ccm KCl-Lösung von 0,36 % + **2,5 ccm** unseres Reagenses	103
b' Parallelversuch von b	103

Wie ersichtlich, ist bei Anwendung von 2,5 ccm Reagens das Volum des Kobaltgelbs bedeutend größer als bei Anwendung von 1,5 ccm. In der Mutterlauge von a und a' konnte ebenso wenig noch Kalium gefällt werden als in der von b und b'. Der einzige Unterschied zwischen beiden Fällungen bestand darin, daß die in a und a' sehr fein war (die Krystalle hatten eine Größe zwischen 0,010 mm und 0,014 mm), während sie in b und b' größtenteils zu makroskopisch sichtbaren Partikelchen zusammengesintert waren, die durch ihre Unregelmäßigkeit nicht aneinander paßten und daher ein größeres Volumen vortäuschten.

Wir müssen noch einen Augenblick bei dem Einfluß der Wasserverdünnung auf das Volum verweilen und zwar im Zusammenhang mit der Anwendung des von Biilmann zu qualitativen Zwecken empfohlenen Natriumkobaltinitrits, womit wir anfangs viel gearbeitet haben, weil man es als Salz in fertigem Zustand in schöner Form (von Kahlbaum) beziehen kann. Die folgende Tabelle V gibt eine Übersicht über den auch hier konstatierten Einfluß der Wasserverdünnung.

Tabelle V.

Einfluß von Wasserverdünnung auf die Fällung des Kaliums mittels Natriumkobaltinitrit (Biilmann).

Flüssigkeiten	Volum des Kobaltgelbs
10 ccm KCl-Lösung von 0,15% + 1 ccm 16%iges Natriumkobaltinitrit	60
10 ccm KCl-Lösung von 0,15% + 30 ccm Wasser + 1 ccm 16%iges Natriumkobaltinitrit	32
10 ccm KCl-Lösung von 0,15% + 7 ccm 16%iges Natriumkobaltinitrit	82
10 ccm KCl-Lösung von 0,15% + 30 ccm Wasser + 7 ccm 16%iges Natriumkobaltinitrit	65
10 ccm KCl-Lösung von 0,15% + 11 ccm 16%iges Natriumkobaltinitrit . . .	88
10 ccm KCl-Lösung von 0,15% + 30 ccm Wasser + 11 ccm 16%iges Natriumkobaltinitrit . . .	64

Man sieht, daß auch hier durch Verdünnung der KCl-Lösungen mit Wasser das Präcipitat bedeutend abnimmt.

Nach der Vorschrift, die Biilmann für den Nachweis von K gegeben hat, haben wir die Reaktion in der Kälte (0 bis 2°) verlaufen lassen.

Das war auch notwendig, denn bei 37° entstand sowohl ohne wie nach Wasserzusatz nur wenig Kobaltgelb. Statt braungelb war die Flüssigkeit, die sich oberhalb des gebildeten Präcipitates befand, nach der üblichen Zeit (16 Stunden) rosa geworden. Offenbar hatte sich die Biillmannsche Lösung durch die Wärme ziemlich schnell zersetzt; denn die Rosafärbung trat auch auf, wenn die Lösung ohne Kaliumzusatz einige Stunden einer Temperatur von 37° ausgesetzt gewesen war, insbesondere wenn auch etwas Essigsäure vorhanden war. Dieser Zersetzung

zufolge konnte das Kalium nur teilweise gefällt werden, jedenfalls war die Kobaltgelbmenge geringer als wenn die Reaktion in der Kälte verlief.

Im Zusammenhang damit haben wir noch versucht, das Reagens doch noch in brauchbarer Weise zu Volumbestimmungen anzuwenden, indem wir höhere Konzentrationen, aber dann bei 0 bis 2^{0} einwirken ließen. Die Resultate waren aber sehr unbefriedigend, was wohl dem Umstand zuzuschreiben ist, daß bei niederer Temperatur Zusammensinterung stattfand. Das Unbefriedigende bestand darin, daß bei zwei Versuchen mit derselben Chlorkaliummenge und in gleicher Weise ausgeführt, der eine Tag ein anderes Volum an Kobaltgelb lieferte als der andere und daß in derselben Versuchsreihe keine Proportionalität bestand zwischen den untersuchten Kaliummengen und den Volumina des Präcipitats.

Also zeigt sich das Biilmannsche Reagens (Lösung von Natriumkobaltinitrit) in der Wärme ungeeignet für quantitative Kaliumbestimmungen überhaupt, und in der Kälte für volumetrische Bestimmung insbesondere.

C. Einfluß der Temperatur auf die Abscheidung des Kobaltgelbs.

Bei der Erforschung der Temperatur, bei der die anderen Kobaltreagenzien ein homogenes, mikroskopisch feines krystallinisches Präcipitat lieferten, stellte es sich heraus, daß dies bei niedriger Temperatur (0 bis 2^{0}) nicht erreicht wurde. Auch war eine kontinuierliche, mittels eines Motors herbeigeführte Bewegung nicht imstande, die Bildung von größeren Krystallen neben sehr kleinen und neben Krystallkonglomeraten vorzubeugen, so daß selbst bei Einhaltung der richtigen Konzentrationsverhältnisse die Resultate schlecht waren.

Der Unterschied zwischen zwei Parallelversuchen betrug zuweilen 6 oder 7 Teilstriche; auch ließ die Proportionalität zwischen Kaliummenge und Volum des Kobaltgelbs zu wünschen übrig. Damit ist natürlich nicht gesagt, daß in der Kälte die Kaliumabscheidung nicht vollständig war. Unsere Methode stellte aber noch eine andere Anforderung: es sollte eine strenge Proportionalität zwischen Kaliummenge und Volum des Kobaltgelbs bestehen.

Auch erwies es sich nicht empfehlenswert, die Reaktion bei Zimmertemperatur (15 bis 20°) ablaufen zu lassen. Auch in diesem Fall bilden sich am Ende größere Partikelchen. Und wenn sich dann — wir wiederholen es — durch irgendeine Ursache in einem Fall mehr von solchen großen Partikelchen gebildet haben als im andern Fall, so bekommt man selbstverständlich nicht dieselben Volumina.

Wir werden den Leser mit den vielen, in den betreffenden Versuchen erhaltenen Zahlen nicht ermüden.

Vollkommen befriedigende Resultate haben wir folgenderweise erreicht: Flüssigkeit und Reagens werden bei Zimmertemperatur unter sehr sanfter Bewegung[1]) miteinander vermischt; es bildet sich dann fast innerhalb einiger Minuten der größte Teil der krystallinischen Masse als ein äußerst feiner gelber Niederschlag. Dann wird das Gemisch in einen Brutschrank von +37° gebracht, um der Reaktion während 16 Stunden die Gelegenheit zu geben, bei dieser Temperatur abzulaufen. Dabei behält der Niederschlag seine Feinheit; von Zusammensintern ist nicht die Rede und auch größere Krystalle bilden sich nicht. Wir wiederholen aber, daß dieses Resultat nicht erzielt wird, wenn eine allzu große Kobaltsalzkonzentration im Gemisch vorhanden ist (vgl. S. 429, Tab. IV).

D. Gegenwart von anderen Stoffen.

a) Natrium.

Nun wir die Bedingungen für eine vollständige und für volumetrische Bestimmungen brauchbare Kaliumabscheidung aus einer reinen Chlorkaliumlösung besprochen haben, erübrigt es sich noch zu untersuchen, wie man zu handeln hat in Fällen, in denen, wie üblich, neben Kaliumsalz auch andere Stoffe in der Lösung vorkommen. Und dann denkt man in erster Linie an Natrium. Dieses Metall kommt wohl fast ohne Ausnahme in organischen Flüssigkeiten, Zellen und Geweben vor und gelangt bei der Untersuchung der Asche, gleichgültig, ob man dieselbe auf trockenem oder auf nassem Wege erhalten hat, neben Kalium zur Abscheidung. Nun hat Gilbert gefunden, daß

[1]) Vgl. Anmerkung 2, S. 455.

das gebildete Kobaltgelb verschiedene Mengen Natrium im Molekül enthält, je nachdem mehr oder weniger Natrium vorhanden ist. In unserem Fall nun war es von wesentlichem Interesse, zu wissen, inwieweit der Eintritt von Na in das Molekül das Volum der Krystalle beeinflussen würde.

Um das zu untersuchen, haben wir KCl-Lösungen angefertigt, die bedeutende NaCl-Mengen enthielten, darunter so große, wie in Flüssigkeiten biologischer Herkunft nicht vorkommen.

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß das anzuwendende NaCl mit Kobaltreagens keine Spur Kobaltgelb bildet, also absolut kaliumfrei war, wurden folgende Mischungen bereitet:

a, a' } 10 ccm einer KCl-Lös. v. 0,72% + 10 ccm Wasser
b, b' } 10 „ „ „ „ 0,72% + 10 „ NaCl-Lös. v. 1%
c, c' } 10 „ „ „ „ 0,72% + 10 „ „ „ 2%
d, d' } 10 „ „ „ „ 0,72% + 10 „ „ „ 4,5%
e, e' } 10 „ „ „ „ 0,72% + 10 „ „ „ 9%.

Von diesen Mischungen wurden je 5 ccm mit 1,5 ccm Kobaltreagens (nach schwacher Ansäuerung mit Essigsäure) versetzt. Alle Lösungen enthielten also die gleiche KCl-Menge.

Wir lassen hier einen der Versuche folgen.

Tabelle VI.

Einfluß von NaCl auf das Volum des Kobaltgelbs.

Flüssigkeiten	Volum des Kobaltgelbs
a 5 ccm KCl-Lös. v. 0,36%	90,5
a' 5 „ „ „ 0,36%	91,0
b 5 „ „ „ 0,36%, in der sich befindet 0,50% NaCl	91,0
b' 5 „ „ „ 0,36%, „ „ „ „ 0,50% „	91,0
c 5 „ „ „ 0,36%, „ „ „ „ 1,00% „	91,5
c' 5 „ „ „ 0,36%, „ „ „ „ 1,00% „	91,0
d 5 „ „ „ 0,36%, „ „ „ „ 2,25% „	91,0
d' 5 „ „ „ 0,36%, „ „ „ „ 2,25% „	91,0
e 5 „ „ „ 0,36%, „ „ „ „ 4,50% „	98,0
e' 5 „ „ „ 0,36%, „ „ „ „ 4,50% „	99,0

Man ersieht, daß die Anwesenheit selbst von 2,25 % NaCl das Volum des Kobaltgelbs nicht beeinflußt hat. War 4,5 % zugegen, so war das Volum vergrößert (98 und 99); war 9 % zugegen, so war das Volum 112 und 112. In beiden Fällen war die mehrmals erwähnte Zusammensinterung zu beobachten. Vielleicht muß diese wohl allein für die Volumzunahme verantwortlich gemacht werden. Bei den übrigen NaCl-haltigen Flüssigkeiten (d, d', c, c', b, b') hatte das Kobaltgelb ein feines homogenes Aussehen.

Wir lassen jetzt eine Kaliumbestimmung in einer künstlichen Asche folgen, aus der in der üblichen Weise alle Substanzen außer K und Na entfernt waren. Die Asche war folgenderweise zusammengesetzt:

15	ccm	KCl-	Lösung	von	0,72 %
2	„	NaCl-	„	„	9,00 %
15	„	Na_2CO_3-	„	„	5,00 %
10	„	$Na_2HPO_4 . 12\,aq$-	„	„	3,00 %
5	„	$Na_2SO_4 . 10\,aq$-	„	„	4,00 %
1	„	Fe_2Cl_6-	„	„	1,00 %
2	„	$CaCl_2 . 6\,aq$-	„	„	3,00 %
2	„	$MgCl_2 . 6\,aq$-	„	„	2,00 %.

Das Gemisch wird mit Wasser zu 60 ccm angefüllt.

Daneben wird eine KCl-Lösung bereitet durch Vermischung von 15 ccm 0,72 %iger KCl-Lösung und 15 ccm H_2O. 10 ccm der künstlichen Aschelösung enthalten also dieselbe Menge KCl wie 5 ccm der Chlorkaliumlösung, d. h. 0,018 g KCl.

Die Behandlung der künstlichen Asche war folgende:

Von der trüben wässerigen Flüssigkeit werden in ein Glasrohr (vgl. S. 452) 10 ccm abgemessen und mit 0,9 ccm HCl-Lösung 1 : 1 versetzt. Die Flüssigkeit ist sauer und vollkommen klar geworden.

Zusatz aus einer Bürette von einer 10 %igen $BaCl_2$-Lösung bis keine Fällung mehr entsteht, was dadurch konstatiert wird, daß nach 5 Minuten Zentrifugieren die obenstehende Flüssigkeit bei weiterem Zusatz von $BaCl_2$ klar bleibt. Dann wird 11 ccm einer 0,5 %igen $Ba(OH)_2$-Lösung hinzugefügt und die Phosphorsäure gefällt. Nachdem das Gemisch in einem geschlossenen Glasrohr ein paar Stunden sich selbst überlassen gewesen ist, wird die Flüssigkeit vom weißen Präcipitat getrennt. Man pflegt solches durch Filtration und Auswaschung zu erzielen. Viel schneller und bequemer erfolgt es aber durch Zentrifugierung: man hebt oder gießt die klare Flüssigkeit ab und bringt dieselbe in ein Glasrohr. Dann

wird 2 ccm einer 0,5%igen $Ba(OH)_2$-Lösung hinzugefügt, gut vermischt, wieder zentrifugiert, dieses Waschwasser zu der soeben genannten abgehobenen Flüssigkeit gefügt und diese Behandlung noch zweimal wiederholt. Das Kalium kann dann praktisch als ausgewaschen betrachtet werden.

Jetzt handelt es sich darum, das Übermaß von Barium zu entfernen. Zu diesem Zweck wurde ein Gemisch von Ammoniak und Ammoniumcarbonat hinzugefügt, auch wieder bis kein Niederschlag mehr entstand. Das Gemisch bestand aus gleichen Teilen einer reinen Ammoniumcarbonatlösung von 10% und von 29%igem reinen Ammoniak[1]). Nach 2 Stunden wurde abzentrifugiert, die Flüssigkeit abgegossen und das Präcipitat zweimal mit 3 ccm der Ammonium-Ammoniumcarbonatlösung mittels der Zentrifuge ausgewaschen. Nachdem die ammoniakalische Flüssigkeit mit Waschwasser in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade abgedampft und der trockene Rückstand sanft geglüht war, so daß alles Ammoniak und Ammoniumcarbonat vertrieben war, wurde der Rückstand in 4 ccm Wasser gelöst und die Lösung in ein Zentrifugenrohr gebracht und behufs der vollkommenen Entfernung des lediglich aus KCl und NaCl bestehenden Salzgemisches aus der Schale auf 5 ccm gebracht. Nach Ansäuern mit ein wenig Essigsäure, Zusatz von 1,5 ccm unseres Kobaltreagenses wurde in der gewöhnlichen Weise das Kalium bestimmt.

Das Resultat war überaus befriedigend:

Tabelle VII.

Bestimmung des Kaliums in einer künstlichen Asche.

Flüssigkeiten	Volum des Kobaltgelbs
5 ccm KCl-Lösung von 0,36% + 1,5 ccm Kobaltreagens	91,0
5 „ „ „ 0,36% + 1,5 „ „	90,5
10 „ der künstlichen Asche + 1,5 „ „	91,0
10 „ „ „ „ + 1,5 „ „	91,0

Es wird den Leser nicht interessieren, mehr Kontrollversuche dieser Art zu vernehmen. Denn schließlich betrifft die Kontrolle im wesentlichen die übliche Methode zur Abscheidung des K und Na aus der Asche. War ja die Zuverlässigkeit unserer volumetrischen K-Bestimmungsmethode in Gegenwart von NaCl bereits nachgewiesen.

b) Gegenwart von Na, Mg, SO_3, P_2O_5.

Eine Angelegenheit von größerer Bedeutung dürfte in der folgenden Frage gelegen sein.

---

[1]) Diese Flüssigkeit gab nach Verdampfung keine Reaktion auf Kalium.

Ist es nicht möglich die soeben angewandte übliche Methode der Entfernung von für die Kaliumbestimmung schädlichen Substanzen abzukürzen?

Nach den Untersuchungen von Gilbert (l. c.) soll die Kaliumabscheidung mittels Kobaltreagenses nicht nur bei Anwesenheit von Na, sondern auch in Gegenwart von Erdalkalimetallen und von den Metallen der Schwefelammoniumgruppe gelingen, ungeachtet ob sie als Chloride, Nitrate, Sulfate gelöst seien. Nur Ammonium darf nicht vorhanden sein, ebensowenig Phosphorsäure.

Nach Gilbert kann man Ammoniak durch Destillation mit Calciumhydrat entfernen, wodurch zugleich die Abscheidung etwa vorhandener Phosphorsäure erfolgen soll. Der Extrakt des Rückstandes soll nach dem Ansäuern mit Essigsäure zur Abscheidung des Kaliums geeignet sein. Borsäure und Kieselsäure seien durch Abrauchen mit Fluorwasserstoff und Schwefelsäure zu entfernen.

Es fragt sich nun: hat die Gegenwart von Ca, Mg und SO_4 Einfluß auf das Volum des Kobaltgelbs?

Denn, wie auch beim Natrium hervorgehoben wurde, ist es in unserem Fall nicht genügend, zu wissen, ob in Gegenwart dieser Ionen alles Kalium niedergeschlagen wird, man muß auch wissen, inwieweit das Volum der gefällten Kobaltverbindung dadurch geändert wird.

Natürlich fingen wir an zu untersuchen, ob $CaCl_2$, $MgCl_2$, $MgSO_4$ und $CaSO_4$, alles Verbindungen, die in der Asche vorzukommen pflegen, mit Kobaltreagens Fällungen gaben. Das war nicht der Fall; wohl aber wurde eine Fällung von Barium mit unserem Reagens beobachtet, was aber in casu keine praktische Bedeutung hat.

Da also Ca, Mg und SO_4 mit Kobaltreagens keine Fällung gab, war es von Interesse zu untersuchen, ob ihre Anwesenheit das Volum des Kaliumnatriumkobaltinitrits (Kobaltgelb) beeinflussen würde. Eine Reihe von Versuchen lehrte, daß auch das nicht der Fall war.

Jetzt konnten wir uns die weitere Frage vorlegen, ob dieser Befund es ermöglichen würde, die Vorbereitung zur Kaliumbestimmung abzukürzen. Bei diesem Projekt aber stießen wir auf die Phosphorsäure. Es ließ sich voraussehen, daß eine

vollständige Entfernung nötig sein würde; denn eine Lösung von Natriumphosphat gab mit unserem Kobaltreagens eine deutliche Fällung.

IV. Versuche, um die Vorbereitung zur Kaliumbestimmung in der Asche abzukürzen.

A. Entfernung der Phosphorsäure durch Erhitzung mit $Ca(OH)_2$.

Deshalb wurde die nunmehr auch phosphathaltige künstliche Asche (vgl. S. 434) nach Ansäuerung mit Salzsäure, dem Vorschlag von Gilbert entsprechend, mit $Ca(OH)_2$ in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade bis zur Trockne erhitzt, der Rückstand mit Wasser aufgenommen und nach Ansäuerung des Auszugs mit Essigsäure, darin das K mittels Kobaltlösung niedergeschlagen.

Versuch.

10 ccm der auf S. 434 erwähnten künstlichen Aschenlösung werden mit HCl 1 : 1 versetzt, bis die Trübung sich vollständig aufgelöst hat. Die nunmehr saure Flüssigkeit wird in einer Porzellanschale mit 3 g reinem Calciumhydrat zur Trockne erhitzt. Der Rückstand wird mit 10 ccm Wasser ausgelaugt. Die etwas trübe Flüssigkeit wird in ein Glasrohr übergespült, sowie auch die 2 mal 5 ccm trübes Waschwasser, womit der Rückstand der Schale ausgewaschen wird. Die 20 ccm im Glasrohr befindliche trübe Flüssigkeit wird durch Zentrifugieren von den festen Partikelchen befreit und die klare Flüssigkeit mit den 4×5 ccm Waschwasser in einer Porzellanschale zu 4 ccm eingeengt. Nach Ansäuerung mit etwas Essigsäure, wodurch alles klar wird, schlägt man das Kalium durch Kobaltreagens nieder.

Das Volum beträgt in den beiden Parallelversuchen 84 und 83,5, statt 91. Aus diesem Versuch geht hervor, daß bei der Behandlung mit $Ca(OH)_2$ Kalium zurückgehalten ist, obgleich doch unserer Meinung nach gehörig ausgewaschen war. War dann vielleicht ein Teil des Kaliums durch Adsorption aus festem $Ca(OH)_2$ zurückgeblieben? Wenn ja, so ließ es sich erwarten, daß Anwendung einer viel geringeren Kalkmenge günstigere Resultate geben würde.

Deshalb wiederholten wir den Versuch mit dem Unterschied, erstens daß jetzt statt 3 g $Ca(OH)_2$ nur 0,5 g genommen wurde, was ja nach der Berechnung mehr als ausreichen sollte, um das überschüssige HCl zu sättigen und alle P_2O_5 zu binden. Zweitens wurde die reine KCl-Lösung in genau derselben Weise

behandelt wie die künstliche Asche, und drittens eine künstliche Asche ohne Phosphat angefertigt und ebenfalls in der gleichen Weise mit Kalk behandelt.

Tabelle VIII.

Versuch zur Entfernung von Phosphorsäure mittels $Ca(OH)_2$.

	Flüssigkeiten	Volum des Kobaltgelbs
a	10 ccm der künstlichen Asche (S. 434). [Behandlung mit $Ca(OH)_2$]	87,0
a′	Parallelversuch von a	87,0
b	10 ccm der phosphatfreien künstlichen Asche. [Behandlung mit $Ca(OH)_2$]	79,0 [1]
b′	Parallelversuch von b	81,0
c	5 ccm KCl-Lösung von 0,36 % [Behandlung mit $Ca(OH)_2$]	81,0
c′	Parallelversuch von c	81,5

Aus dieser Tabelle erhellt, daß wenn eine reine KCl-Lösung (c und c′) in der angegebenen Weise mit $Ca(OH)_2$ behandelt wird, eine bedeutende Menge K ($91 - 81 = 10$) zurückgehalten wird. Wie aus b′ hervorgeht, üben die in der phosphatfreien künstlichen Asche auf die Zurückhaltung (Adsorption?) des Kaliums keinen Einfluß aus. Und wie endlich aus a und a′ hervorgeht, hat das Phosphat die Zurückhaltung von K vermindert.

Vielleicht würde eine energischere Auswaschung des $Ca(OH)_2$ näher zum Ziel geführt haben. Wir haben das nicht untersucht und es vorgezogen, jedenfalls die Methode aufzugeben, weil die Anwendung solcher großen Flüssigkeitsmengen ihre Nachteile hat. Außerdem war der Gilbertsche Vorschlag zur Kalkbehandlung nicht mehr als eine Suggestion, die man in seiner betreffenden Arbeit durch Versuchsresultate nicht bewiesen findet.

B. Entfernung der Phosphorsäure mittels einer Lösung von $CaCl_2$ und $Ca(OH)_2$.

Der Versuch, die Phosphorsäure in dieser Weise zu entfernen, stammt aus dem Stadium unserer Untersuchungen, in dem wir den (alkalischen) wäßrigen Auszug der (Serum) Asche

[1]) Etwas bei der Bewirkung verloren gegangen.

studierten[1]). Da meinten wir, mittels einer Lösung von $CaCl_2$ und $Ca(OH)_2$ sowohl CO_2 wie P_2O_5 entfernen zu können. Zu diesem Zweck fertigten wir ein Gemisch von gleichen Volumina 10 %iger Chlorcalciumlösung und gesättigter Kalkwasserlösung an. Als künstlichen wäßrigen Aschenauszug nahmen wir eine Mischung von der folgenden Zusammensetzung:

15	ccm	KCl-	Lösung	von	0,72 %,
10	„	NaCl-	„	„	9,00 %,
15	„	Na_2CO_3-	„	„	5,00 %,
10	„	Na_2HPO_4-	„	„	3,00 %,
5	„	Na_2SO_4-	„	„	4,00 %.

Dieses Gemisch wurde zu 60 ccm mit Wasser verdünnt. Nennen wir diese Flüssigkeit A.

Daneben wurde eine Flüssigkeit B hergestellt, die ebenfalls 15 ccm KCl-Lösung von 0,72 % enthielt und weiter ebenso zu 60 ccm mit Wasser verdünnt war.

Es sollte nun aus der Mischung A die CO_2 und P_2O_5 entfernt werden.

Es wurde das erzielt, indem wir zu 10 ccm der Flüssigkeit A, die sich in einem Glasrohr befand, aus einer Bürette etwas von der genannten Kalklösung zufließen ließen. Es entstand dann ein Niederschlag, der abzentrifugiert wurde, wozu nicht mehr als einige Minuten erforderlich waren. Dann ließen wir noch ein Paar Tropfen der Kalklösung aus der Bürette zufließen; entstand dann ein Niederschlag, so wurde wieder zentrifugiert, nochmals etwas Kalklösung hinzugefügt usw., bis die klare Lösung nicht mehr durch die Kalksolution getrübt wurde. Dann vermischten wir wieder, zentrifugierten, hoben die klare Flüssigkeit ab, die in eine Porzellanschale übergebracht wurde und fast alles Kalium enthalten sollte. Weiter wurde der Niederschlag einige Male mit Kalkwasser (ohne $CaCl_2$)

[1]) Wie H. Rose zuerst (1849) nachgewiesen hat (l. c.), bleibt nach Auslaugung mit Wasser immer noch Kalium (und Natrium) in der Asche zurück; es bildet sich namentlich bei der Veraschung das in Wasser unlösliche $CaKPO_4$ und $CaNaPO_4$. Diese Substanzen sind löslich in HCl. Daher kommt es, daß man in den betreffenden Lehrbüchern eine Auslaugung auch mit HCl vorgeschrieben findet. Den Grund dafür fand ich nirgendwo angegeben. In den in diesem Paragraph mitgeteilten Untersuchungen laugten wir die Asche bloß mit Wasser aus. (Vgl. Anmerkung auf S. 460.)

ausgewaschen und jedesmal das klare Waschwasser in die genannte Porzellanschale gebracht, und mit der ursprünglichen Flüssigkeit vermengt, zu etwa 4 ccm auf dem Wasserbade eingeengt. Nach Ansäuerung mit verdünnter Essigsäure bis zur eben sauren Reaktion, brachten wir die Flüssigkeit in ein Zentrifugierrohr und spülten die Schale mit etwas Wasser einige Male aus.

Es befanden sich dann im Zentrifugierrohr die Bestandteile von 10 ccm von Flüssigkeit A, jetzt aber befreit von CO_2, PO_4, einem Teil der SO_4, aber vermischt mit ein wenig Calcium, das jedoch der Reaktion mit Kobaltreagens nicht schadet. (Der Gebrauch von Barium statt Calcium hatte keine befriedigenden Resultate geliefert.)

Zu der also erhaltenen schwach sauren Flüssigkeit wurde 1,5 ccm unseres Kobaltreagenses hinzugefügt.

Daneben wurden nun 10 ccm der reinen Chlorkaliumlösung B zu etwa 4 ccm auf dem Wasserbade eingeengt und unter Hinzufügung von ein wenig Essigsäure ebenfalls mit 1,5 ccm Kobaltreagens versetzt.

Endlich wurde als dritte Flüssigkeit noch eine reine Chlorkaliumlösung genommen, die mit derselben Menge $CaCl_2$ und $Ca(OH)_2$ versetzt war, die auch für A angewandt war.

Von diesen drei Experimenten wurden Parallelversuche angestellt.

Wir lassen jetzt die Resultate dieser Versuche folgen.

Tabelle IX.

	Flüssigkeiten	Volum des Kobaltgelbs
a	10 ccm Flüssigkeit A wird gefällt mit 6,5 ccm Kalkmischung ($CaCl_2$ 10%/₀ und Kalkwasser zu gleichen Volumina). Nach kräftigem Zentrifugieren wird in der obenstehenden Flüssigkeit, die man scharf abgießen kann, das Kalium bestimmt mittels 1,5 ccm des Kobaltreagenses	105
a′	Parallelversuch von a	105
b	10 ccm Flüssigkeit b, ohne Kalkbehandlung, versetzt mit 1,5 ccm Kobaltreagens	92
b′	Parallelversuch von b	93
c	10 ccm Flüssigkeit b, versetzt mit 6,5 ccm Kalkmischung, 1,5 ccm Kobaltreagens	105
c′	Parallelversuch von c	105

Aus dieser Versuchsreihe geht hervor, daß die mit Kalkmischung behandelten Lösungen A und C mehr Kobaltgelb geliefert haben als die reine Chlorkaliumlösung.

Wir kamen auf den Gedanken, daß vielleicht die Kalkmischung nicht frei von Kalium gewesen sei, obgleich die Präparate, die wir vorher untersucht hatten, kein Kalium enthielten. Es schien aber nicht unmöglich, daß entweder das Kalkwasser oder die $CaCl_2$-Lösung oder beide Kalium aus dem Glas aufgenommen hatten. Nun waren in der Tat die Lösungen etwa 14 Tage alt. Bei näherer Untersuchung zeigte es sich nun, daß 6,5 ccm der Mischung 11 Teilstriche Kobaltgelb lieferten und daß das $CaCl_2$ daran schuld war. Zieht man also von 105 11 ab, so bekommt man 94. Damit ist also das Resultat in ziemlich befriedigender Weise erklärt.

Wir heben also mit Nachdruck hervor, daß man stets frische oder nicht mehr als 2 bis 3 Tage alte Calciumlösungen zur Fällung des Phosphates anwenden soll.

Man kann auch ältere nehmen, wenn man die Flaschen, in denen man sie aufbewahrt, paraffiniert.

Wir geben jetzt noch eine Versuchsreihe, die bezweckte zu erforschen, ob, wenn statt 10 ccm der Lösungen 5 ccm gebraucht wurden, in den drei Fällen die Hälfte des Niederschlages, also etwa 47 Kobaltgelb, sich bildete.

Tabelle X.

	Flüssigkeiten	Volum des Kobaltgelbs
a	5 ccm Flüssigkeit A wird gefällt mit 3,25 ccm Kalkmischung ($CaCl_2$ 10% + Kalkwasser) zu gleichen Volumina). Nach kräftigem Zentrifugieren wird in der obenstehenden Flüssigkeit, die man scharf abgießen kann, das Kalium bestimmt mittels 1,5 ccm des Kobaltreagenses	43,0
a'	Parallelversuch von a	43,5
b	5 ccm Flüssigkeit B, ohne Kalkbehandlung, versetzt mit 1,5 ccm des Kobaltreagenses	47,0
b'	Parallelversuch von b	46,0
c	5 ccm Flüssigkeit B, versetzt mit 3,25 ccm Kalkmischung und 1,5 ccm des Kobaltreagenses	46,0
c'	Parallelversuch von c	46,0

Die Resultate dieser Tabellen sind nicht befriedigend, insoweit, daß die mit Kalkmischung behandelte Flüssigkeit A eine Kobaltgelbmenge lieferte, die bedeutend kleiner war als die von Flüssigkeit B und ebenso als von Flüssigkeit C. Später stellte sich heraus, daß versäumt war, die weißen Niederschläge von a und a′ und c und c′ mit Kalkwasser auszuwaschen.

Eine Wiederholung des Versuchs, wobei dieses Versäumnis vermieden wurde, ergab dann befriedigende Resultate. Dabei haben wir uns zur gleichen Zeit überzeugt, daß die Auswaschungsflüssigkeit gerade für die Differenz verantwortlich gemacht werden mußte.

Wir lassen jetzt noch eine Versuchsreihe folgen, in der der Versuch mit 10 ccm Flüssigkeit A und B und mit 5 ccm Flüssigkeit A und B nebeneinander ausgeführt wurde.

Tabelle XI.

	Flüssigkeiten	Volum des Kobaltgelbs
a	5 ccm Flüssigkeit A + 6,5 ccm Kalkmischung; Präcipitat mit 6,5 ccm Kalkwasser ausgewaschen. Die ursprüngliche und die Wasch-Flüssigkeit miteinander vermischt und zu 4 ccm auf dem Wasserbade eingeengt; ansäuern durch geringe Menge Essigsäure; Zusatz von 1,5 ccm Kobaltreagens	93,0
a′	Parallelversuch von a	93,0
b	10 ccm Flüssigkeit B + 6,5 ccm Kalkmischung eingeengt zu 4 ccm, angesäuert mit ein wenig Essigsäure, Zusatz von 1,5 ccm Kobaltreagens	92,0
b′	Parallelversuch von b	92,0
a″	5 ccm Flüssigkeit A + 3,25 ccm Kalkmischung. Präcipitat mit 3,25 ccm Kalkwasser ausgewaschen. Die ursprüngliche und die Wasch-Flüssigkeit miteinander vermischt und zu 4 ccm auf dem Wasserbade eingeengt; ansäuern durch geringe Mengen Essigsäure; Zusatz von 1,5 ccm Kobaltreagens	47,0
a‴	Parallelversuch von a″	46,5
b″	5 ccm Flüssigkeit B + 3,25 ccm Kalkmischung eingeengt in 4 ccm, angesäuert mit ein wenig Essigsäure; Zusatz von 1,5 ccm Kobaltreagens	45,5
b‴	Parallelversuch von b″	45,0

Aus dieser Versuchsreihe erhellt folgendes:

1. Zunächst bringt a, a′, b, b′ eine Bestätigung des erwähnten Befundes, daß aus der Mischung von KCl, NaCl, Na_2CO_3, Na_2SO_4, Na_2HPO_4, das Kalium entfernt und in zuverlässiger

Weise quantitativ bestimmt werden kann. Das nämliche gilt bei der Vergleichung von a″, a‴, b″, b‴.

2. Vergleicht man den Mittelwert von a, a′ mit dem Mittelwert von a″, a‴, so ergibt sich eine befriedigende Proportionalität. Diese Proportionalität wird auch beobachtet bei dem Vergleich des Mittelwerts von b, b′ und von b″ und b‴.

3. Sehen wir, daß ein Übermaß von Kobaltreagens auf das Volum des erhaltenen Kobaltgelbs keinen Einfluß ausübt. Der Leser wird ja bemerken, daß zu dem Kalium von 5 ccm der Lösung dieselbe Menge Kobaltreagens, nämlich 1,5 ccm, hinzugefügt wurde wie zu dem Kalium von 10 ccm.

Endlich wollen wir noch eine der mit Serum ausgeführten Versuchsreihen erwähnen.

Es werden 2 mal 25 ccm Pferdeserum getrocknet und verascht und von der Asche ein wäßriger Auszug hergestellt. Das gleiche wird getan mit 2 mal 25 ccm Serum, zu dem je 5 ccm der Chlorkaliumlösung B (15 ccm KCl 0,72 + 45 H_2O) hinzugefügt waren. In den vier Flüssigkeiten wird nach dem angegebenen Verfahren das Kalium bestimmt.

Das Resultat ist folgendes:

Tabelle XII.

Serum, mit einer bekannten KCl-Menge versetzt	Mittelwert
a 25 ccm Serum liefern . . . . 69 Kobaltgelb a′ Parallelversuch von a . . . . 69,5 „	69,25
b 25 ccm Serum + 5 ccm KCl 0,18 % liefern 115 „ b′ Parallelversuch von b . . . . 116 „	115,5

Der Unterschied zwischen beiden Mittelwerten ist 46,25, das ist also ein Wert, der dem von 5 ccm reiner KCl-Lösung (vergl. obige Tabelle) sehr nahe kommt.

Trotz der Verbrennung des Serums und des wiederholten Auswaschens, wobei natürlich Spuren verloren gehen können, findet man die hinzugefügte K-Menge zurück.

Erwähnt sei noch ein anderer Versuch, in dem mehr KCl zum Serum hinzugefügt wurde und zwar 5 ccm einer 0,72 %igen KCl-Lösung, was $0{,}036 \cdot \frac{39{,}1}{74{,}6} = 0{,}01887$ g K entspricht.

Tabelle XIII.

Serum, mit einer bekannten KCl-Menge versetzt	Mittelwert
a 25 ccm Serum liefern . . . . 65 Kobaltgelb a' Parallelversuch von a . . . . 65 „	65
b 25 ccm Serum + 5 ccm KCl 0,72 % liefern 252 „ b' Parallelversuch von b . . . . 251 „	251,5

Zieht man von 251,5 65 ab, so bleibt für die hinzugefügte KCl-Menge 186,5, was nach dem Mittelwert eines Teilstrichs mit 186,5 · 0,0001 g = 0,01865 g Kalium übereinstimmt, eine Abweichung deshalb von bloß 0,00022 g Kalium.

Aus diesen Versuchen geht also hervor, daß die Behandlung mit dem angewandten Kalkgemische brauchbare Resultate geliefert hat. Von einer Zurückhaltung eines Teils des Kaliums, die bei der Erhitzung mit festem $Ca(OH)_2$ beobachtet wurde (S. 438), ist nicht die Rede und auch die Entfernung der Phosphorsäure ist eine genügende. Ich sage eine „genügende“, nicht eine vollständige, denn man kann in der mit Kalkmischung behandelten Flüssigkeit mittels molybdänsauren Ammoniaks noch deutlich Phosphorsäure nachweisen.

Letzterer Befund hat nun Veranlassung gegeben, zu untersuchen, wieviel Phosphorsäure in einer reinen KCl-Lösung vorhanden sein darf, ohne Störung zu verursachen.

c) Wieviel Phosphorsäure (Phosphat) darf in einer KCl-Lösung vorhanden sein, ohne zu stören?

Um diese Frage zu beantworten, wurden folgende Flüssigkeiten bereitet:

5 ccm KCl-Lösung von 0,36 %
5 ccm „ „ „ , in der sich befand 0,2 ccm Na_2HPO_4-Lösung von 3 %
5 ccm „ „ „ , in der sich befand 0,2 ccm Na_2HPO_4-Lösung von 6 %
5 ccm „ „ „ , in der sich befand 0,5 ccm Na_2HPO_4-Lösung von 6 %.

Diese Flüssigkeiten werden in Parallelversuchen in der gewöhnlichen Weise mit ein wenig Essigsäure und 1,5 ccm unseres Reagenses versetzt. Nachdem die Gemische während 16 Stunden im Brutofen verweilt haben, wird das Volum des Kobaltgelbs ermittelt.

Die folgende Tabelle enthält die Resultate.

Tabelle XIV.

Der Einfluß von Anwesenheit verschiedener Phosphorsäuremengen in einer reinen KCl-Lösung auf das Volum des Kobaltgelbs.

Flüssigkeiten	Volum des Kobaltgelbs
a 5 ccm KCl-Lösung von 0,36 %$_0$ + 1,5 ccm Kobaltreagens	92
a' Parallelversuch von a	92
b 5 ccm KCl-Lösung von 0,36 %$_0$ + 0,2 ccm Phosphatlösung von 3 %$_0$ + 1,5 ccm Kobaltreagens	92
b' Parallelversuch von b	92
c 5 ccm KCl-Lösung von 0,36 %$_0$ + 0,2 ccm Phosphatlösung von 6 %$_0$ + 1,5 ccm Kobaltreagens	92
c' Parallelversuch von c	92
d 5 ccm KCl-Lösung von 0,36 %$_0$ + 0,5 ccm Phosphatlösung von 6 %$_0$ + 1,5 ccm Kobaltreagens	92
d' Parallelversuch von d	92

Wie ersichtlich, hat sogar 0,5 ccm Phosphatlösung von 6 %$_0$ das Volum des durch 5 ccm KCl-Lösung von 0,36 %$_0$ herbeigeführten Niederschlages weder vermehrt noch vermindert.

Um die Phosphatmenge kennen zu lernen, die das Volum des Präcipitates wohl beeinflussen würde, wurden statt 0,5 ccm Phosphatlösung 1 ccm und 2 ccm genommen und dann, um die Lösungen weniger konzentriert zu machen, diese hinzugefügt zu resp. 5 ccm KCl-Lösung von 0,36 %$_0$ + 4 ccm Wasser, und 5 ccm KCl-Lösung von 0,36 %$_0$ + 3 ccm Wasser. Um das Verhältnis zwischen den Volumina der zu untersuchenden Flüssigkeit und des Reagenses (5 : 1,5) innezuhalten, wurde 3 ccm Reagens benutzt. Es stellte sich aber heraus, daß so viel Phosphat nicht ohne schädlichen Einfluß war; denn die Volumina des Präcipitates betrugen jetzt 97 und 102.

Also konnte ohne Schaden für die K-Bestimmung 0,5 ccm 6 %$_0$iger Phosphatlösung von 3 %$_0$ = 0,006 g P_2O_5 hinzugesetzt werden.

Nachdem dies festgestellt war, wurde untersucht, ob 10 ccm der künstlichen Asche (S. 434), die ebenfalls 5 ccm KCl-Lösung 0,36 %$_0$ enthielt und weiter 0,6 ccm Natriumphosphat von 3 %$_0$, also nur 0,3 ccm von 6 %$_0$, ebenfalls 91 oder 92 Teilstriche Kobaltmenge liefern würde, wie das in den Gemischen

von reiner KCl-Lösung und Phosphatlösung (Tab. XIV) der Fall gewesen war. Leider war das nicht der Fall; die Volumina des Niederschlages betrugen 97 und 97. (Natürlich war die künstliche Asche erst mit HCl behandelt, dann das Übermaß von HCl mittels kalifreier NaOH-Lösung gesättigt, und die also erhaltene Flüssigkeit vor dem Zusatz von Kobaltreagens mit ein wenig Essigsäure angesäuert.)

In künstlicher Asche darf man somit bei unserer Kaliumbestimmung die Anwesenheit von Phosphorsäure nicht vernachlässigen.

Man muß also vor der Kaliumbestimmung die Phosphorsäure, wenn auch nicht vollständig, aber doch möglichst gut entfernen. Wir haben gesehen, daß hierzu das von Gilbert ausgedachte, aber nicht experimentell begründete Verfahren [Erhitzung mit festem $Ca(OH)_2$] wenig empfehlenswert ist. Das von uns sub B geprüfte Verfahren (S. 438) gab gute Resultate, wurde aber nur beim alkalischen wäßrigen Ascheauszug angewandt, was natürlich nicht ausschließt, daß es sich auch wohl beim salzsauren Auszug benutzen lassen wird. Man hat lediglich die überschüssige Salzsäure mit reiner NaOH-Lösung zu sättigen und die also erhaltene Flüssigkeit mit ein wenig Essigsäure anzusäuern, um die Flüssigkeit für die K-Bestimmung fertig zu haben.

Wir haben es jedoch vorgezogen, noch eine andere Methode zu prüfen, die ein wenig einfacher in der Ausführung sein dürfte und der vorigen gegenüber jedenfalls den Vorteil hat, kein neues Kochsalz in die Flüssigkeit zu bringen. Freilich sind große Mengen NaCl zulässig, wie wir gesehen haben (S. 433), aber für die zweckmäßige Krystallbildung hat der Zusatz doch seine Grenze.

D. Entfernung der Phosphorsäure mittels Magnesiamixtur.

Die Entfernung der Phosphorsäure mittels Magnesiamixtur schien mir sehr empfehlenswert: zunächst ist sie eine weitgehende; ferner erfolgt die Neutralisation der Salzsäure im sauren Aschenauszug mittels Ammoniak, der in leichter Weise durch Glühen entfernt werden kann, und das eingeführte Magnesium ist nicht schädlich; auch beträgt es nicht viel.

Berechnen wir erst, wieviel Mixtur man braucht, um in unserer künstlichen Asche und im Auszug von Serum- und Blutasche die Phosphorsäure zu fällen.

Wir bereiteten die Magnesiummixtur durch Auflösung von 55 g krystallisiertem Magnesiumchlorid und 70 g Ammoniumchlorid in 650 ccm Wasser und Zusatz von so viel Ammoniak von 0,96 spez. Gewicht, daß das Flüssigkeitsvolum 1 l betrug. (Ammoniak von 0,96 spez. Gewicht enthält $\pm 10\%$ Ammoniak; hat man also Ammoniak von 30%, so kann man die 350 ccm des verdünnteren Ammoniak daraus bereiten.)

In 60 ccm unserer künstlichen Asche befinden sich 10 ccm Natriumphosphatlösung von 3%, also in 10 ccm der Aschelösung $1/6$ ccm von 3% $= 0,05$ g Phosphat. Da das Molekulargewicht von $Na_2HPO_4 + 10\,aq$ 358 beträgt und zwei Moleküle 1 P_2O_5 enthalten $= 142$, werden in 10 ccm der künstlichen Asche $0,05 \times \frac{142}{2 \times 358} = 0,05 \times \frac{1}{5} = 0,01$ g P_2O_5 vorhanden sein.

Nun fällt 1 ccm der beschriebenen Magnesiamixtur 0,04 g P_2O_5.

Also werden 0,01 g P_2O_5 gefällt durch $1/4$ ccm der von uns gebrauchten Magnesiamixtur.

In ähnlicher Weise läßt sich mit Hilfe der Abderhaldenschen Tabellen für die Zusammensetzung des Blutes[1]) berechnen, daß z. B.

25,0 ccm	Rinderserum	brauchen würden:	0,150 ccm	der Mixtur
2,5 „	Rinderblut	„ „	0,075 „	„ „
2,0 „	Rinderblutkörperchen	„ „	0,120 „	„ „

Bis jetzt haben wir die Anwendung von Magnesiamixtur bloß für künstliche Gemische von KCl und Natriumphosphat und für künstliche Asche untersucht.

Beschreiben wir nur die Experimente mit künstlicher Asche. Die mit natürlicher Asche erfordern keine Abänderung.

10 ccm der trüben Mischung von S. 434 werden mit 0,9 ccm HCl 1 : 1 versetzt, wodurch die Flüssigkeit klar und sauer wird. Dann setzt man Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion hinzu, wodurch sich das Eisen als Hydroxyd niederschlägt. Was nun das Volum der zuzusetzenden Magnesiamixtur betrifft, so haben wir zunächst gefunden, daß die theoretische Menge (hier 0,25 ccm) nicht genügt. Man braucht etwa 1 ccm. Die doppelte Menge, also 2 ccm, ist nicht empfehlenswert; auch nicht die Hälfte, d. h. 0,5 ccm.

[1]) Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. 25, 106 bis 108, 1898.

Auch ist strengstens davon abzuraten, bei der Fällung der Phosphorsäure mittels Magnesiamixtur Erhitzung anzuwenden, wie das Schmitz empfiehlt (1906)[1]. Tut man das, so hat das in der zurückbleibenden Flüssigkeit vorhandene Kalium erheblich abgenommen. Ich kann das nur dadurch erklären, daß sich dabei außer $Mg(NH_4)PO_4$ auch $MgKPO_4$ bildet. Im allgemeinen haben mir Verbindungen dieser Art, u. a. auch $CaKPO_4$ viele Schwierigkeiten verursacht. Bezüglich ihres Vorkommens haben mich die alten Untersuchungen von Heinrich Rose[2]) auf diesen Gedanken gebracht. Leider sind sie ziemlich allgemein vergessen. Es wird nützlich sein, daran zu denken, wenn man nach Schmitz das von ihm erhaltene $Mg(NH_4)PO_4$ in Pyrophosphat umwandelt und wägt. Die Möglichkeit scheint mir groß, daß auch $MgKPO_4$ zugegen ist.

Läßt man die Phosphorsaureammoniakmagnesia in der Kälte sich absetzen, so zeigt, wie wir gefunden haben, die von Phosphorsäure befreite Flüssigkeit kein Kaliumdefizit. Nur muß man, wie erwähnt, nicht allzu wenig Mixtur anwenden; sonst ist die Phosphorsäurefällung unvollkommen und man bekommt störende Verbindungen von Kobaltphosphat (bei mikroskopischer Untersuchung nahezu farblose Rosettchen).

Verfolgen wir nunmehr die Technik.

Wir versetzten also die 10 ccm der künstlichen Asche mit Ammoniak bis zur deutlich alkalischen Reaktion; dann wurde 1 ccm Magnesiamixtur hinzugefügt und 24 Stunden an einen kühlen Ort gesetzt.

Nach dieser Zeit wird im selben Rohr, in dem das Präcipitat von $Mg(NH_4)PO_4$ und $Fe_2(OH)_6$ sich gebildet hat, der Niederschlag abzentrifugiert, was wenig Zeit in Anspruch nimmt; die Flüssigkeit wird abgehoben und möglichst vollständig in ein Porzellanschälchen übergebracht. Dann wird der Rückstand mit 3 ccm Ammoniak von etwa 10% tüchtig vermischt, die trübe Flüssigkeit wird zentrifugiert, die obenstehende Flüssigkeit abgehoben und in das Porzellanschälchen gebracht und diese Auswaschung des Präzipitates noch zweimal in derselben Weise wiederholt. Jetzt wird die Flüssigkeit mit Waschwasser in der Porzellan-

[1]) Vgl. hierzu Traedwell, Quantitative Analyse.

[2]) H. Rose, Poggendorffs Annal. 76, 1 und 330, 1849; 77, 288, 1849.

schale zur Trockne eingedampft und der trockne Rückstand vorsichtig geglüht bis keine Dämpfe mehr entweichen. Alles Ammoniak und Chlorammonium sind dann vertrieben.

Der Rückstand wird in 4 ccm Wasser gelöst, mit Hilfe von 1 ccm Wasser in ein Glasrohr übergebracht (S. 452), mit ein wenig Essigsäure zur schwachsauren Reaktion versetzt und in der beschriebenen Weise mit 1,5 ccm Kobaltreagens beschickt.

Wir lassen jetzt einige Zahlen folgen, erst um nachzuweisen, daß bei Erhitzung mit Magnesiamixtur Kalium gebunden wird.

Tabelle XV.

Entfernung von Phosphorsäure mittels Magnesiamixtur (unter Erhitzung).

		Teilstriche Kobaltgelb
a	10 ccm künstl. Aschelösung + 1 ccm Magnesiamixtur (Reduktion zu 5 ccm Flüssigkeit; 1,5 ccm Kobaltlös.)	87
a'	Parallelversuch von a	87
b	10 ccm künstl. Aschelösung + 2 ccm Magnesiamixtur (Reduktion zu 5 ccm Flüssigkeit; 1,5 ccm Kobaltlös.)	76
b'	Parallelversuch von b	76

Diese Versuche lehren, daß statt 91 nur 87 bzw. 76 Volumteile Kobaltgelb erhalten wurden. Es muß also bei der Behandlung mit Magnesiamixtur im Phosphatpräcipitat Kalium zurückgehalten sein. In der Tat zeigt es sich, daß bei Anwendung von 2 ccm Magnesiamixtur mehr Kalium festgelegt wurde als bei Anwendung von 1 ccm. Man kann sich, wie schon erwähnt, diese Zurückhaltung kaum anders erklären als durch Bildung von $MgKPO_4$.

Es fragt sich nun, ob in der Kälte dann wohl alles Kalium freigelassen wird.

Deshalb wurde der Versuch wiederholt mit dem Unterschied, daß jetzt die Magnesiamixtur 18 Stunden bei 0 bis 2° einwirken konnte.

Bei dieser Temperatur waren die Resultate durchaus befriedigend: Die Kobaltgelbmenge in einer Versuchsreihe betrug 91,5 und 91, wenn 1 ccm Magnesiamixtur gebraucht war. Waren 2 ccm Magnesiamixtur gebraucht, so betrug das Kobaltgelbvolum 88 und 88. Also etwas zu wenig, wahrscheinlich, weil der Überschuß von Ammoniak noch zu klein war.

Es war nun von Interesse, zu untersuchen, ob man mit weniger als 1 ccm Mixtur auch auskommen würde. Theoretisch ist 0,25 ccm bereits genügend (vgl. S. 447). Deshalb prüften wir in derselben Versuchsreihe 0,25, 0,5, 1 und 1,5 ccm Mixtur und um die Bedingungen übrigens unverändert zu halten, versetzen wir die salzsaure Aschelösung mit nicht mehr als mit der zur deutlichen Neutralisation nötigen Ammoniakmenge.

Es stellte sich nun heraus, daß nach der gewöhnlichen Behandlung und Hinzufügung von 1,5 ccm Kobaltreagens, sowohl beim Gebrauch von 0,5 ccm, wie von 0,25 ccm Magnesiamixtur, das Volum des Niederschlages mehr als 150! betrug. Beim Gebrauch von 1 ccm Mixtur war das Kobaltvolum wieder 91; war aber 1,5 ccm Mixtur gebraucht, so betrug das Volum des Kobaltgelbs 90 und 89, also wieder etwas zu wenig.

Durch äußere Umstände waren wir genötigt, diese Untersuchungen vorläufig abzuschließen. Es ist sehr wahrscheinlich, daß bei Anwendung von mehr Ammoniak der Zurückhaltung auch von geringen Kaliummengen vorzubeugen sein wird; auch wenn man mehr als 1,5 ccm Mixtur gebraucht. Hauptsache aber ist hier, daß man die Vorbereitung zur Kaliumbestimmung einer Aschelösung durch Anwendung von Magnesiamixtur erheblich abkürzen kann.

Die Einzelheiten werden später bei den betreffenden Flüssigkeiten eine Besprechung finden.

V. Beschreibung der Methodik unserer Kaliumbestimmung.

Schreiten wir jetzt zu der Beschreibung der Methodik, wie wir dieselbe nach zahlreichen Proben und Gegenproben vorschlagen können.

A. Apparatur[1]).

a) Die trichterförmigen Röhrchen.

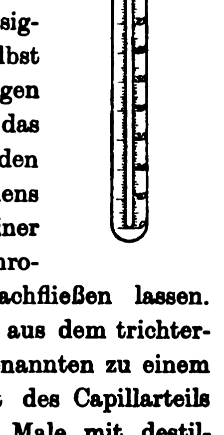
Die Röhrchen, in denen die Volumbestimmungen des Kobaltgelbs ausgeführt werden, sind dieselben, die ich früher beschrieben und abgebildet habe in meiner Arbeit: Eine Methode

---

[1]) Dieselbe kann man ganz oder teilweise von Herrn J. J. Boom, Mechaniker des hiesigen physiologischen Instituts, beziehen.

zur Bestimmung des osmotischen Druckes sehr geringer Flüssigkeitsmengen[1]).

Der trichterförmige Teil hat einen Inhalt von etwa 2,5 ccm. Der Hals, dessen kalibrierter Teil eine Länge von 57 mm bei einem Inhalt von 0,04 ccm hat, ist unten zugeschmolzen. Derselbe ist in 100 Teile geteilt, so daß der Raum zwischen zwei Teilstrichen 0,0004 ccm entspricht. Viel kommt auf eine sehr genaue Kalibrierung an; deshalb genügt es für den Fabrikanten nicht, den Raum von 0,04 ccm mittels Quecksilber zu bestimmen und dann in der üblichen Weise die entsprechende Rohrlänge in gleichen Teilen zu verteilen, sondern es ist notwendig, die Kalibrierung der verschiedenen Stellen durch wiederholtes Auswägen zu bewerkstelligen. Auch die Reinigung der Röhrchen ist wichtig. Dieselbe erfolgt durch Behandlung mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure, derselben Flüssigkeit, die man auch für die bekannten Chromsäure-Elemente benutzt. Hierzu saugt man die chromsaure Flüssigkeit in ein Glasrohr auf, das man sich selbst in einer Bunsenschen Flamme zu einem langen Capillar ausgezogen hat. Man bringt nun das mit Bichromatlösung gefüllte Glasrohr in den capillaren Teil des trichterförmigen Röhrchens und läßt die braune Lösung zufließen. Aus einer gewöhnlichen Pipette kann man weitere Bichromatlösung in den trichterförmigen Teil nachfließen lassen. Man wartet einige Stunden, wirft die Lösung aus dem trichterförmigen Teil weg und entfernt mittels des genannten zu einem Capillar ausgezogenen Glasrohres den Inhalt des Capillarteils des Trichterröhrchens und spült wiederholte Male mit destilliertem Wasser aus.



Endlich müssen die Röhrchen getrocknet werden. Das erfolgt einfach dadurch, daß man die Trichterröhrchen, mit der offenen Seite nach unten gekehrt, in die Zentrifuge setzt.

[1]) H. J. Hamburger, diese Zeitschr. 1, 263, 1906. Vgl. auch Hamburger, Journ. de Physiol. normale et de Pathol. 1900, 889; Osmotischer Druck und Ionenlehre 1, 379, 1902.

Das Wasser wird dann vollständig ausgeschleudert. Dieses Verfahren ist weit besser als Trocknung im Trockenschrank, weil es sich so leicht ereignen kann, daß das destillierte Wasser einige Verunreinigungen gelöst enthält, die sich natürlich beim Eintrocknen auf der Capillarwand absetzen.

b) Verschließbare Glasröhren.

Bei unserer Methode wurden wiederholte Male verschließbare Glasröhren benutzt, und zwar nicht nur für die Abscheidung des Kobaltgelbs, sondern auch für die Auswaschung von Niederschlägen, wozu man sonst immer Filter zu gebrauchen pflegt. Jeder, der ein Präcipitat auszuwaschen hat, weiß, wieviel Zeit und Mühe eine vollständige Auswaschung oft kostet. Wir können nicht genug den Gebrauch der Zentrifuge dafür empfehlen. Man hat nur die Flüssigkeit abzuzentrifugieren, abzuheben, durch Waschflüssigkeit zu ersetzen, diese mit dem Niederschlag innig zu vermischen, wieder zu zentrifugieren und die genannten Manipulationen ein- oder zweimal zu wiederholen, und man hat in viel sichererer, bequemerer und schnellerer Weise die Auswaschung erzielt als mittels Auswaschung auf dem Filter. Es ist fast unverständlich, daß man diese Methoden im chemischen und physiologischen Laboratorium kaum anwendet.

Die von uns gebrauchten Röhren waren angefertigt aus vorzüglichem Glas, das mit Hinsicht auf anderweitige Anwendungen auch die Sterilisation in Wasserdampf ertrug. Sie hatten einen Inhalt von 40 ccm. Natürlich können auch Röhren von anderen Größen angewandt werden. Wir besitzen Sätze von verschiedenem Inhalt. Sie können hermetisch verschlossen werden. Wir erzielten das durch Ebonitstöpsel, die mittels Gummiring genau ins Glasrohr passen. Muß man die Glasröhren in strömenden Wasserdampf sterilisieren, so empfiehlt es sich, statt Ebonit Kupfer zu nehmen. Aber auch hier wird der Verschluß durch Gummiring erzielt.

Man hat beim Zentrifugieren immer daran zu denken, daß durch die Luftströmung Verdampfung stattfindet. Daher ist es im allgemeinen ratsam, die Röhren zu verschließen. Außerdem können etwaige saure Dämpfe auf das Metall der Zentrifuge nachteilig wirken. Aus denselben Gründen ist es nötig,

die Röhren zu schließen, wenn sie sich während einer langen Zeit im Brutschrank befinden.

c) Die Zentrifuge.

Die Zentrifuge, die wir anzuwenden pflegen, ist eine Runnesche. Dieselbe besteht aus einer kupfernen Schale, die auf einem Elektromotor angebracht ist. Innerhalb der Schale befindet sich ein Gestell, das 4 Metallhülsen trägt. In diesen Metallhülsen können 4 Gefäße von je 80 ccm Platz finden. Es werden Gestelle dabei geliefert, die gestatten, auch Gefäße von kleinerem Inhalt zu enthalten. Weiter stehen noch 4 Metallgestelle, die je 3 Trichterröhrchen fassen können, zur Verfügung, so daß 12 solcher Röhrchen gleichzeitig zentrifugiert werden können. Diese Gestelle sind derart konstruiert, daß die Röhrchen nicht auf den Boden des capillaren Teils, sondern auf den schmalen Teil des Trichters ruhen. Sonst würden die Röhrchen durch den Druck zerbrechen. Der Motor bringt die Schale in Bewegung und damit auch das vierarmige Kreuz, das in der Schale befestigt ist. Die Maschine läuft bei sorgfältiger Fundamentierung äußerst ruhig. Es ist als ob sie stillstände. Die Tourenzahl beträgt 3000 pro Minute. Auch jede andere Zentrifuge mit ruhigem Gang kann benutzt werden; es ist nichts weiter nötig, als daß die Tourenzahl 3000 beträgt; dieselbe darf größer oder kleiner sein.

B. Das Kobaltreagens.

50 g krystallisiertes Cobaltum nitricum wird in 100 ccm Wasser gelöst und die Lösung mit 25 ccm Eisessig versetzt. Nennen wir diese Lösung A.

Daneben werden 50 g $NaNO_2$ (kaliumfrei) in 100 ccm Wasser gelöst. Nennen wir diese Lösung B.

Die beiden Flüssigkeiten können sehr lange Zeit aufbewahrt werden.

Um aus den beiden Flüssigkeiten das Reagens anzufertigen, mischt man 6 Volumteile von A mit 10 Volumteilen von B, so daß das Reagens ungefähr $17^0/_0$ krystallisiertes Kobaltnitrat enthält.

Es findet bei der Mischung von A und B eine bedeutende Gasentwicklung statt. Es ist nicht ratsam, die Mischung gleich

zu verwenden, denn die Gasentwicklung ist nicht in kurzer Zeit vollständig beendigt; befinden sich Gasteilchen in der Präcipitatmasse, so kann das zu Fehlern Veranlassung geben. Deshalb warten wir etwa 5 Stunden mit dem Gebrauch des Reagenses.

Wir pflegen nicht viel mehr zu bereiten, als wir in den nächsten 2 Tagen zu verwenden gedenken, und setzen es in dieser Zeit an einen kühlen Ort. Vielleicht hält es sich viel länger, aber die Mühe der neuen Anfertigung ist so gering, daß man irgendeine Schwächung nicht zu riskieren braucht.

C. Die Menge des Reagenses.

Wie erwähnt (vgl. S. 427), ist das Verhältnis zwischen dem Volum der Flüssigkeit und dem des Reagenses von ausschlaggebender Wichtigkeit.

Wir erhielten immer zuverlässige Resultate, wenn 5 ccm der Kalium enthaltenden Flüssigkeit mit 1,5 ccm des Reagenses versetzt wurden, also nahezu 4 % krystallisiertes Kobaltsalz (Nitrat) enthielt. Nimmt man viel mehr Reagens, z. B. 2,5 ccm Reagens auf 5 ccm Flüssigkeit, so entstehen Konglomerate und die Volumbestimmung liefert keine zuverlässigen Resultate (S. 429).

Es ist gleichgültig, ob die 5 ccm Flüssigkeit wenig oder viel Kalium enthalten. 0,0001 g Kalium gibt 0,0004 ccm gleich 1 Teilstrich Kobaltgelb; 0,0002 g Kalium liefern 2 Teilstriche; 0,010 g Kalium liefern 100 Teilstriche Kobaltgelb. Es hat sich herausgestellt, daß 0,020 g Kalium noch durch 1,5 ccm Reagens vollständig gefällt wird (vgl. Tabelle XVI, S. 458). Glaubt man mehr Kalium in der zu untersuchenden Flüssigkeit zu haben, so bringt man entweder das Flüssigkeitsvolum auf 10 ccm und fügt 3 ccm Reagens hinzu oder man gebraucht nur die Hälfte, d. h. 5 ccm, und setzt 1,5 ccm Reagens hinzu. Wir wiederholen: um ein feines, gleichmäßiges Präcipitat zu bekommen, kommt es darauf an, das Verhältnis zwischen dem Volum der zu untersuchenden Flüssigkeit zu dem des Reagenses auf 5 : 1,5 zu haben. Zu diesem Zweck wird die zu untersuchende Flüssigkeit immer auf etwa 4 ccm in einer kleinen Porzellanschale auf dem Wasserbade in ein Glasrohr (vgl. sub b S. 452) übergegossen und mit kleinen Mengen destillierten Wassers bis zu

1 ccm nachgespült. Es befinden sich dann etwa 5 ccm Flüssigkeit im Glasrohr.

D. Versuchsverfahren und Genauigkeitsgrad.

5 ccm der bei Anwesenheit nicht zulässiger Stoffe vorbereiteten (vgl. unter III, S. 432 und IV) und jedenfalls mit Essigsäure schwach angesäuerten Flüssigkeit[1]) befinden sich in einem sub 2 erwähnten Glasrohr. Mittels einer platten oder zylindrischen Pipette werden 1,5 ccm des Kobaltreagenses hinzugefügt, während man das Rohr sanft[2]) schüttelt. Es bildet sich fast unmittelbar ein feines gelbes bis orangegelbes Präcipitat; dann wird das Rohr mittels Ebonitdeckels verschlossen und in einen Brutschrank von $+ 37^{0}$ versetzt.

Nach einer halben Stunde wird der Inhalt ein wenig umgeschüttelt, nach einer zweiten, dritten und vierten halben Stunde wieder. Dann wird er sich selbst überlassen. Nachdem die Flüssigkeit während 16 oder 18 Stunden sich selbst überlassen gewesen ist, wird das Rohr aus dem Schrank genommen und man läßt die Flüssigkeit bei Zimmertemperatur abkühlen.

Es soll jetzt das Volum des Kobaltgelbs ermittelt werden. Zu diesem Zweck setzt man das Rohr in die Zentrifuge; bereits nach 10 Minuten oder einer Viertelstunde ist man imstande, die klare Flüssigkeit abzuheben.

Es empfiehlt sich selbstverständlich nicht, dieselbe vollständig abzusaugen; denn man braucht etwas Mutterlauge, um das Präcipitat in das trichterförmige Röhrchen überzubringen. Hierbei hat man folgendes zu beachten.

Es liegt auf der Hand, daß es erwünscht ist, das Kobaltgelb als eine vollkommen homogene Masse von gleichmäßiger Dichte in allen Schichten des Capillarteils zu haben. Um das zu erzielen, wird folgenderweise verfahren: Mittels eines zu einem Ca-

---

[1]) Freie Mineralsäuren dürfen nicht vorhanden sein. Darin löst sich das Kobaltgelb.

[2]) Kräftiges Schütteln ist zu vermeiden; denn die Krystallchen sind äußerst spröde. Man kann sich davon leicht überzeugen, wenn man ein wenig der krystallinischen Masse auf einen Objektträger bringt und das Deckglas unter geringem Druck ein wenig hin- und herbewegt. Man sieht dann eine große Menge klein zersplitterter Krystallpartikelchen von verschiedener Gestalt.

pillar ausgezogenen Glasrohrs wird der capillare Teil des Trichterröhrchens mit Flüssigkeit gefüllt, die soeben aus dem Glasrohr abgehoben war und die in einem Reagensglas immer aufbewahrt wird entweder für den Fall, daß man sie später noch einmal zu untersuchen wünscht, oder für den Fall, daß es sich herausstellen möchte, daß nicht genug Reagens hinzugefügt war, um alles Kalium zu fällen. Es ist also die Mutterlauge der Krystallmasse. Dann wird 1 ccm der gelben Suspension in das Trichterröhrchen gebracht. Man sieht die krystallinische Masse bereits ohne Zentrifugierung im Capillar sich zu Boden senken. Es wird zentrifugiert, erst langsam, allmählich kräftiger. Hierzu genügt eine Viertelstunde. Dann wird die klare Flüssigkeit aus dem trichterförmigen Teil entfernt und durch 1 ccm neue Suspension ersetzt; wieder wird zentrifugiert usw. Wenn das Kobaltgelb möglichst vollständig aus dem Glasrohr entfernt ist, wird der Rückstand mit klarer Mutterlauge nachgespült; schließlich wird bis zum konstanten Volum zentrifugiert. Dazu genügt noch eine halbe Stunde. Wünscht man absolute Sicherheit zu haben, so zentrifugiert man noch eine weitere Viertelstunde und konstatiert, ob das Volum unverändert geblieben ist. Die Pipette von 1 ccm, die zum Überbringen des Präcipitates angewandt wird, wird, um etwaigem Verlust vorzubeugen, immer wieder in das Glasrohr zurückgebracht.

Vielleicht wird der Leser fragen, warum die Kobaltgelbsuspension nicht auf einmal in das Trichterröhrchen gebracht wurde? Hat man es ja in der Hand, um die klare Flüssigkeit so weit aus dem Glasrohr abzuheben, daß nicht mehr als 2 ccm, d. h. ungefähr der Inhalt des Trichterchens, zurückbleibt.

Wir antworten darauf, daß es mit Hinsicht auf eine homogene Kompression des Kobaltgelbs besser ist, erst einen Teil des Kobaltgelbs, an einen anderen usw. zusammenzupressen. Unwillkürlich vergleicht man den Mechanismus mit dem Fall, daß eine sehr große Menschenmasse eine schmale Gasse passieren muß und einige Personen vorzeitig an die vor ihnen Gehenden vorübergehen wollen. Es entsteht dann an dem betreffenden Ort eine Stauung, die einer gleichmäßigen Verteilung der Menschenmasse entgegenwirkt. Wie dem auch sei, wie unsere sehr zahlreichen Versuche gelehrt haben, bekommt man in der angegebenen Weise sehr schön übereinstimmende

Resultate. Die Ablesung erfolgt mit unbewaffnetem Auge oder mittels einer Lupe.

Oft liegt die Oberfläche des Präcipitates schief auf der Achse des Capillars; es ist dann jedoch nicht schwer, den wahren Stand zu schätzen. Man wird dabei wohl niemals einen größeren Fehler als $^1/_4$ Teilstrich machen, was 0,000025 g Kalium entspricht. Man kann aber die schiefe Lage der Oberfläche leicht in eine horizontale verändern, wenn man mittels eines zu einem feinen Capillar ausgezogenen Glasrohres, die oberflächliche Schicht des Kobaltgelbs wegsaugt, in die obenstehende Flüssigkeit verteilt und aufs neue zentrifugiert.

Arbeitet man nach dem beschriebenen Verfahren, so ist der Genauigkeitsgrad ein überaus befriedigender.

Gelegentlich unserer Ausführungen bei der Ausarbeitung der Methode hat der Leser sich bereits ein Urteil darüber bilden können.

Zunächst hat es sich herausgestellt, daß, wenn man unter gleichen Umständen arbeitet, dieselbe Kaliummenge immer übereinstimmende Volumina an Kobaltgelb liefert. Zum Überfluß erwähnen wir hier noch die Resultate von 6 Parallelversuchen, in denen 5 ccm einer KCl-Lösung von 0,36 $^0/_0$ nach schwacher Ansäuerung mit Essigsäure, nach Zusatz von $1^1/_2$ ccm Kobaltreagens lieferten. Wir fanden: 91, 91, 91,5, 91, 91,5 und 91 Verteilungen Kobaltgelb[1]).

Nebenbei sei erwähnt, daß als Mittelwert zahlreicher Versuche für 5 ccm einer KCl-Lösung von 0,36 $^0/_0$, 91 Verteilungen Kobaltgelb gefunden wurden

Somit entsprechen 100 Verteilungen (0,04 ccm) $0{,}018 \times \frac{100}{91}$ g KCl $= 0{,}018 \times \frac{100}{91} \times \frac{39 \cdot 1}{74 \cdot 6} = 0{,}010026$ g Kalium, rund 10 mg Kalium.

[1]) Obgleich $^1/_4$ Verteilung leicht geschätzt werden kann, haben wir diese nicht angegeben. Wir nahmen an, daß, um ein Beispiel zu nennen, wenn die Oberfläche des Niederschlages zwischen 91 und $91^1/_4$ lag, das Volum 91 betrug. Lag die Oberfläche zwischen $91^1/_4$ und $91^1/_2$, so wurde $91^1/_2$ gerechnet. Oberhalb $91^1/_2$ wurde das Volum als 92 angesehen.

Der aufmerksame Leser wird bemerkt haben, daß wir auch wohl 92, 93, ja sogar 94 fanden. Das rührt aus der Zeit, daß wir uns von dem Einfluß des Glases nicht bewußt waren und auch ältere Lösungen gebrauchten (vgl. S. 441). Die vorliegenden Zahlen betreffen eine frische KCl-Lösung (vgl. auch S. 433 u. 435).

Jede Verteilung Kobaltgelb zeigt also 0,0001 g Kalium an. Bei sorgfältigem Arbeiten wird ein Fehler von einer Verteilung nicht gemacht.

Wenn man unter gleichen Umständen arbeitet, ist die Methode sehr zuverlässig.

Aber man muß weitere Anforderungen stellen.

Da man in der Praxis nicht weiß, wieviel Kalium in einer Flüssigkeit vorhanden ist, so muß innerhalb weiter Grenzen ein Überschuß von Reagens ohne Einfluß auf das Volum des Kobaltgelbes sein. Mit andern Worten: Ob, um ein Beispiel zu nennen, 0,018 g KCl mit 1,5 ccm Kobaltreagens versetzt wird oder mit 3 ccm, das Volum des erhaltenen Kobaltgelbs muß in beiden Fällen 91 betragen. Das war in der Tat auch der Fall. Nur hat man dafür zu sorgen, daß das Verhältnis zwischen dem Volum der zu untersuchenden Flüssigkeit und dem Reagens sich verhalte wie 5 zu 1,5. Gebraucht man also 3 ccm Reagens, so muß das Flüssigkeitsvolum auf 10 ccm gebracht werden.

Endlich hat man die Anforderung zu stellen, daß Proportionalität besteht: eine n-fache Menge KCl muß genau ein n-faches Volum Kobaltgelb liefern.

Wir haben früher nachgewiesen, daß dies in der Tat der Fall ist. Zum Überfluß erwähnen wir noch eine neue Versuchsreihe.

Tabelle XVI.

Proportionalität zwischen Kaliummenge und Volum des Kobaltgelbs.

Flüssigkeiten	Volum des Kobaltgelbs	
	Gefunden	Berechnet
a 5 ccm KCl-Lösung von 0,36 % + 1,5 ccm Reagens	91,0	91,0
a′ Parallelversuch von a	91,0	
b 5 ccm KCl-Lösung von 0,18 % + 1,5 ccm Reagens	45,5	45,5
b′ Parallelversuch von b	45,0	
c 5 ccm KCl-Lösung von 0,72 % + 1,5 ccm Reagens	181,5	182,0
c′ Parallelversuch von c	182,0	
d 10 ccm KCl-Lösung von 0,36 % + 3 ccm Reagens	182,0	182,0
d′ Parallelversuch von d	181,0	
e 5 ccm KCl-Lösung von 1,08 % + 1,5 ccm Reagens	237,0	273,0
e′ Parallelversuch von e	237,0	

Aus den Versuchen a und a', b und b', c und c', d und d' geht deutlich hervor, daß zwischen der gebrauchten Kaliummenge und dem Volum des Kobaltgelbs eine strenge Proportionalität besteht. Versuch e, e' zeigt davon eine erhebliche Abweichung. Aber die hinzugefügte Kobaltmenge ist für 0,054 g KCl zu gering (237 statt 273), was auch daraus hervorgeht, daß Hinzufügung von Reagens zu der Mutterlauge aufs neue ein Präcipitat herbeiführte.

Es wird jetzt möglich sein, mit sehr geringen Quantitäten zu arbeiten; so z. B. enthält 1 g Menschenblut[1]) ungefähr 0,0004 g Kalium, die 14 Teilstrichen entsprechen, also noch eine gut meßbare Menge.

Carl Schmidt fand in 1000 g Menschenserum 0,39 g K_2O = 0,3237 g Kalium. Da, wie wir gefunden haben, jeder Teilstrich rund 0,0001 g Kalium entspricht, repräsentieren 0,3237 g Kalium 3237 Teilstriche, so daß 5 ccm Blutserum etwa 16 Teilstriche Kobaltgelb liefern würden.

Da der Versuchsfehler bei den Volumbestimmungen sicher nicht mehr als eine Verteilung zu betragen braucht, werden in vielen Fällen für die Bestimmung des Kaliums im Blut oder im Serum 1 ccm bzw. 5 ccm. genügen.

E. Vorbereitungen zur Kaliumbestimmung.

Bis jetzt beschrieben wir in diesem Abschnitt (V) die Kaliumbestimmung in reinen KCl-Lösungen. Handelt es sich um die K-Bestimmung in organischen Flüssigkeiten oder festen Substanzen, so hat man der Anwesenheit anderer Stoffe Rechnung zu tragen. Zu diesem Zwecke kann man zunächst die übliche Vorbereitung in Anwendung bringen, nach der man alle Metalle entfernt, bis das K und Na als Chloride zurückbleiben.

Da wir gefunden haben, daß die Anwesenheit selbst von großen Natriummengen auf das Volum des mit den K gebildeten Kobaltgelbes keinen Einfluß ausüben (vgl. S. 433), so kann in der also erhaltenen Flüssigkeit das K bestimmt werden. Die Vorbereitung zur K-Bestimmung ist in diesem Fall also dieselbe wie bei der üblichen Platinmethode, aber von hier an

---

[1]) Vgl. Hammarsten, Lehrb. d. physiol. Chem., VIII. Aufl., S. 307.

beginnt der viel günstigere Umstand, daß man die Gewichtsanalyse durch die viel einfachere und viel genauere Volumbestimmung ersetzt, deren Resultate bei der Platinmethode außerdem durch Anwesenheit von Na in so erheblichem Maße beeinträchtigt werden.

Aber auch die lange Vorbereitung ist nicht nötig. Denn es hat sich herausgestellt, daß nicht nur Na und Cl, sondern auch Ca, Mg und SO_4 das Volum der durch K gebildeten Fällung nicht beeinflussen. Allein Phosphorsäure darf nicht oder bloß in sehr geringer Menge vorhanden sein. Kommt diese in der Asche vor, so soll sie entfernt werden. Handelt es sich um einen alkalisch reagierenden wäßrigen Aschenauszug, so gelangt man durch dessen Behandlung mit $CaCl_2 + Ca(OH)_2$ zum Ziel (vgl. S. 438).

Handelt es sich, wie in der Mehrheit der Fälle, um ein Gemisch von wäßrigem und salzsaurem Auszug[1]), so kann man mit Erfolg Magnesiamixtur anwenden (vgl. S. 446), wodurch auch Eisen entfernt wird.

---

[1]) Man könnte geneigt sein, zu denken, daß alles Kalium wohl mit heißem Wasser ausgelaugt werden wird und eine nachträgliche Extraktion mit Salzsäure überflüssig sei. H. Rose hat aber in zwei sehr beachtenswerten Arbeiten (Poggendorffs Ann. 76, 330, 1849; 77, 288, 1849), die, wie so viele andere alte Arbeiten, leider vergessen sind, nachgewiesen, daß nach dem Ausziehen mit Wasser oft Komplexe von Kalium- und Natriumphosphat mit Phosphaten der alkalischen Erden von „dem Typus von phosphorsaurem Ammoniak Magnesia“ zurückbleiben. Sie sind in Salzsäure löslich. Zwar wird in den Lehrbüchern ganz im allgemeinen bei der Aschenanalyse angegeben, daß die Asche auch mit Säure ausgenommen werden soll, aber nicht warum, und über die Notwendigkeit dieser Extraktion für die Kalium- und Natriumbestimmung wird nicht gesprochen.

Auch wird in der ersterwähnten Abhandlung von Rose nachgewiesen, daß in der mit Salzsäure verkohlten Masse nicht selten noch eine relativ bedeutende K-Menge zurückgeblieben ist, die nach vollkommener Veraschung ausgezogen werden kann. Es stellte sich das heraus sowohl bei seinen Kalium- und Natriumbestimmungen von Blut und Muskeln, wie von Produkten pflanzlicher Herkunft.

Wir haben bei der Veraschung der verkohlten Masse des Blutes nicht soviel Schwierigkeiten empfunden. Vielleicht wohl dank der Anwendung des Heraeus-Ofens, der bei schwacher Rotglühhitze in kurzer Zeit die Sache erledigt und übrigens auch für die Erhaltung des Platintiegels so äußerst empfehlenswert ist.

Es braucht kaum hervorgehoben zu werden, daß dank der Zulässigkeit von Ca, Mg, SO_4 in den beiden Fällen eine erhebliche Abkürzung der Vorbereitung erzielt wird.

Vielleicht läßt sich die Abkürzung noch weiterführen. Es wird davon in den Einzelfällen später die Rede sein.

VI. Zusammenfassung.

1. Es wird eine Methode zur quantitativen Bestimmung geringer Kaliummengen vorgeschlagen. Sie beruht auf der Volumbestimmung mittels Zentrifugierens des durch Kobaltlösung herbeigeführten krystallinischen Niederschlages von Kaliumnatriumkobaltinitrit (Kobaltgelb) $Co(NO_2)_3 \cdot 3(K/Na\,NO_2) + nH_2O$.

2. Die Methode wird derart ausgeführt, daß bei Zimmertemperatur 5 ccm der kaliumhaltenden Flüssigkeit unter sanfter Bewegung versetzt werden mit 1,5 ccm einer Kobaltlösung, deren Anfertigung auf S. 453 angegeben wurde.

Um die Reaktion vollständig zu Ende kommen zu lassen, wird das Gemisch in einem Brutschrank von $\pm 37^0$ C etwa 16 Stunden sich selbst überlassen.

Nach Abkühlung bei Zimmertemperatur wird die feine gelbe bis orangegelbe krystallinische Masse in trichterförmigen Röhrchen zum konstanten Volum abzentrifugiert und es wird im kalibrierten Capillarteil das Volum abgelesen (Einzelheiten S. 450ff.).

Der geeichte Capillarteil hat einen Inhalt von 0,04 ccm und ist in 100 Teile geteilt. Jeder Teilstrich entspricht 0,0001 g Kalium.

Der Versuchsfehler bleibt unter einem Teilstrich, also unter 0,0001 g Kalium, gleichgültig ob die Flüssigkeit wenig oder viel Kalium enthält.

3. Es besteht vollkommene Proportionalität zwischen Kaliummengen und Volumina des Kobaltgelbs.

4. Um die genannten günstigen Resultate zu erreichen, muß das Verhältnis zwischen dem Volum der zu unter-

suchenden Flüssigkeit und dem der Reagensmenge 5 zu 1,5 sein, gleichgültig ob die Kaliummenge groß oder klein sei. Ist so viel Kalium vorhanden, daß 1,5 ccm Reagens nicht genügt, um alles zu fällen und wünscht man doch die sämtliche Menge zu verarbeiten, so soll die zu untersuchende Flüssigkeit auf 10 ccm gebracht werden und statt 1,5 3 ccm Reagens genommen werden.

0,02 g Kalium wird durch die 1,5 ccm Reagens noch vollständig niedergeschlagen.

5. Die Anwesenheit großer Natriummengen beeinträchtigt die Resultate nicht.

Auch ist die Gegenwart von Ca, Mg und SO_4 zulässig.

Allein Phosphorsäure darf nur in sehr geringen Quantitäten vorhanden sein.

Die Vorbereitung des Aschenauszugs von Flüssigkeiten oder festen Stoffen organischer Herkunft erfordert also lediglich die Entfernung der Phosphorsäure.

Für diese Entfernung, die zu gleicher Zeit wohl immer auch etwa vorhandenes Eisen betreffen wird, ist eine Mischung von $CaCl_2$- und $Ca(OH)_2$-Lösung oder vorteilhafter Magnesiamixtur anzuwenden (vgl. S. 438 u. 446). In den Einzelfällen wird diese Vorbereitung näher behandelt.

6. Die Vorteile unserer Methode gegenüber dem Platinchlorid- und $HClO_4$-Verfahren lassen sich dahin zusammenfassen:

a) Die Gewichtsanalyse wird durch die in der Ausführung bequemere und schnellere Volumbestimmung ersetzt.

b) Die Genauigkeit ist eine viel größere und im Zusammenhang damit, darf die Kaliummenge viel geringer sein als sie bei der Platin- oder Überchlorsäuremethode erfordert wird.

So z. B. genügt bei unserer Methode 1 ccm Blut oder 5 ccm Serum, während die Platinmethode wenigstens 40 ccm erfordert (vgl. S. 459), was viele Untersuchungen unausführbar macht. Aber auch wenn man viel mehr Serum nimmt, so bleibt bei der Platinmethode noch der große Nachteil bestehen, daß durch die Anwesenheit von Natrium das zur Wägung gelangende Platinsalz verhältnismäßig abnimmt (vgl. S. 416), während bei

unserer Methode die Gegenwart von Natrium auf das Resultat ohne Einfluß ist (S. 433).

c) Die Tatsache, daß die Reaktion (Bildung und Volum des Kobaltgelbs) durch Anwesenheit von Ca, Mg und SO_4 nicht beeinflußt wird, erlaubt eine kürzere Vorbereitung der Asche organischer Herkunft, als dies behufs der Platin- oder Überchlorsäuremethode der Fall ist.

7. Es wird darauf aufmerksam gemacht, daß die Auswaschung von Niederschlägen bequemer, schneller und genauer erfolgt mittels Zentrifugierung als mittels Filtration.

Der Einfluß des osmotischen Drucks auf das Volum roter Blutkörperchen und das Permeabilitätsproblem.

Eine Berichtigung.

Von

H. J. Hamburger in Groningen.

(Eingegangen am 30. Juli 1915.)

Es ist das Verdienst S. G. Hedins[1]), das erste Mal die Zentrifugalkraft benutzt zu haben um das Volum tierischer Zellen, und zwar von roten Blutkörperchen, zu ermitteln. Das kalibrierte Capillargefäß, in dem er diese Volumbestimmungen vornahm, belegte er mit dem Namen Hämatokrit. Spätere Autoren haben daran einige Modifikationen angebracht.

Hedins betreffende Untersuchungen befassen sich mit der Bestimmung des prozentischen Volumgehalts des Blutes an Blutkörperchen bei Gesunden und Kranken. Zu diesem Zweck vermischte Hedin das Blut mit Müllerscher Flüssigkeit.

Nun hat sich in der Literatur die Meinung eingeschlichen, daß es derselbe Autor gewesen ist, der das erste Mal den Einfluß des osmotischen Drucks auf das Blutkörperchenvolum nachgewiesen hat.

Man kann diese Meinung u. a. lesen in Hammarsten-Hedins Lehrbuch der physiologischen Chemie, 8. Aufl. 1914, S. 7 und S. 306; auch in Höbers Physikalische Chemie der Zelle und Gewebe, und in andern Lehrbüchern und zusammenfassenden Darstellungen. Bei Höber z. B. heißt es S. 78: „Das (d. h. die Messung geringfügiger Volumveränderungen unter Einwirkung von Flüssigkeiten verschiedenen osmotischen Drucks) gelingt nur bei den Blutkörperchen, wenn man nicht die einzelne Zelle, sondern größere Massen zugleich dem Einfluß verschiedener konzen-

[1]) S. G. Hedin, Skandinav. Arch. f. Physiol. 2, 134 u. 360, 1890.

zierter Lösungen unterwirft, in einem Verfahren, das zuerst von Hedin und Gryns angegeben wurde."

Auch in Hedins soeben erschienenem Werke: Grundzüge der physikalischen Chemie in ihrer Beziehung zur Biologie, J. F. Bergmann, Wiesbaden 1915, wird der Eindruck erweckt (vgl. S. 17 und 18), daß dieser Verfasser der erste gewesen sei, der den Einfluß des osmotischen Drucks auf das Volum von Zellen konstatiert hat.

Das nun ist entschieden unrichtig. Der erste, der darüber Untersuchungen angestellt hat und nachwies, daß eine NaCl-Konzentration und eine solche anderer Stoffe ausfindig gemacht werden kann, in der das Volum der Blutkörperchen unverändert bleibt, während sie in einer schwächeren quellen und in einer stärkeren schrumpfen[1]), war ich[2]), und nicht Hedin, dessen Arbeiten über die Beziehungen zwischen Blutkörperchenvolum und osmotischen Druck erst zwei Jahre später erschienen[3]).

Die Veranlassung zu meiner Arbeit vom 17. Juni 1893 war eine Bekämpfung der Behauptung Bleibtreus, daß eine 0,6 $^0/_0$-ige NaCl-Lösung für die Blutkörperchen der Warmblüter als die physiologische Kochsalzlösung zu betrachten sei. Ich wies dann u. a. durch Volumbestimmungen der roten Blutkörperchen mittels Zentrifugalkraft nach, daß dieselben in 0,6 $^0/_0$ iger Kochsalzlösung quellen und in 1 $^0/_0$ iger Kochsalzlösung schrumpfen, während sie in wasserverdünntem Serum eine Zunahme des Volums erfahren.

Es sei hervorgehoben, daß Hedin selbst in seiner genannten Abhandlung vom Jahre 1895 meine Untersuchungen vom 17. Juni 1893 und die vom 27. Januar 1894[4]) bei seiner Bekämpfung der Bleibtreuschen Ansicht bezüglich des Wertes von Volumbestimmungen berücksichtigt.

Auch der zweite, der dann auf die Beziehung zwischen

---

[1]) Diese Konzentrationen bezeichnete ich das erste Mal (1884) mit „hypisotonisch" und „hyperisotonisch".

[2]) Hamburger, Zentralbl. f. Physiol. 17. Juni 1893.

[3]) S. G. Hedin, Skandinav. Arch. 5, 1905; auch Arch f. d. ges. Physiol. 60, 360, 1895.

[4]) In diesem Aufsatz habe ich nach Bleibtreus Antwort noch weitere Volumbestimmungen an einem größeren Material (NaBr, NaJ, Zucker usw.) ausgeführt.

Blutkörperchenvolum und osmotischem Druck hinwies, war, zu urteilen nach der Zeit der Veröffentlichung, chronologisch nicht Hedin, sondern Gryns[1]). Wie C. Eykman mitteilt[2]), führte Gryns diese Untersuchungen auf seine (E.s) Veranlassung aus. Beiläufig sei erwähnt, daß Eykman in seiner Arbeit meinen Aufsatz vom 17. Juni 1893 zitiert und die Richtigkeit meiner Ansichten gegenüber Bleibtreu verteidigt.

Daß Hedin, als er im Jahre 1890 das Hämatokrit in die Welt schickte, den Einfluß des osmotischen Drucks auf das Blutkörperchenvolum nicht kannte, geht noch daraus hervor, daß er ohne weiteres Müllersche Flüssigkeit für die Verdünnung seines Blutes anwandte, was er sonst nicht getan hätte.

Aus dem oben Gesagten geht deutlich hervor, daß die ersten Untersuchungen über die Beziehungen zwischen osmotischem Druck und Volum der Zellen von mir herrühren[3]).

Es ist mir sehr unangenehm, dies so rundweg sagen zu müssen. Wenn aber angesehene Autoren, wie die genannten, die mit Recht allgemein als zuverlässige Führer betrachtet werden, trotz gelegentlicher beiläufiger Richtigstellungen meinerseits[4]), die sie zweifelsohne übersehen haben müssen, fortfahren, eine unrichtige Vorstellung niederzuschreiben, so bleibt mir, da dieselbe schon zu weit verbreitet ist, um mich brieflich an sie zu wenden, nichts anderes übrig, als zu versuchen, den Irrtum in vorliegender mehr auffallender Weise zu beseitigen[5]).

---

[1]) Gryns, Zittingsverslag der Koninkl. Akad. d. Wetensch. te Amsterdam. 24. Februari 1894.

[2]) C. Eykman, Arch. f. d. ges. Physiol. 60, 340, 1895.

[3]) Daß später (1898) die Beziehung zwischen dem Volum anderer Zellen und dem osmotischen Druck der umgebenden Flüssigkeit zuerst von mir studiert wurde, findet man in den genannten Büchern wohl erwähnt.

[4]) Vgl. u. a. Osmotischer Druck und Ionenlehre, Bd. I, S. 188 bis 190, wo ich eine Auseinandersetzung der Angelegenheit gegeben habe.

[5]) Vielleicht ist derselbe derart eingeschlichen, daß die ersten und weiter die meisten anderen Volumbestimmungen von Zellen, mit dem Hämatokrit ausgeführt wurden, so daß man die Begriffe Volumbestimmung und Hedins Hämatokrit ohne weiteres miteinander verbunden hat. Meine ersten Volumbestimmungen aber, die die Beziehung zwischen Volum und osmotischem Druck nachwiesen, wurden in großen Gefäßen ausgeführt, die ich selbst kalibrierte.

Ein ähnlicher Irrtum herrscht u. a. in Höbers Handbuch betreffs meines Anteils an der Permeabilitätsfrage. Auch bezüglich dieser Angelegenheit hat man übersehen, daß ich es war, der im Jahre 1889 das Problem der Permeabilität der tierischen Zellen angebahnt habe, indem ich auf chemischem Wege die Durchgängigkeit der roten Blutkörperchen für Chlor, Phosphorsäure usw. in direkter Weise nachwies. Wiederholte Male habe ich es gelegentlich in meinen diesbezüglichen Arbeiten beiläufig hervorgehoben. In meinem Buch (Osmotischer Druck und Ionenlehre, Bd. I, S. 203) gab ich die genaue historische Entwicklung des Problems. Bis jetzt hat es aber nicht geholfen. Hoffentlich wird man mir die Unannehmlichkeit ersparen, auf diese Angelegenheit zurückkommen zu müssen.

Freilich ist es für die Wissenschaft gleichgültig, ob A. oder B. etwas nachgewiesen hat. Hauptsache ist nicht, wer eine Tatsache gefunden hat, sondern daß sie gefunden wurde. Wenn man aber das persönliche Element berücksichtigt, so ist es gut, auch hier ebenso wie beim Sachlichen, Genauigkeit nachzustreben, und wo unwillkürlich eine Ungenauigkeit eingeschlichen ist, diese zu beseitigen. Übrigens glaube ich, daß jeder, wenn auch unbewußt, bei der Zitierung wohl einmal gesündigt hat, gegenüber sehr alten Autoren vielleicht oft.

Über die Beziehungen der tödlichen Dosis zur Oberfläche.

Von

Karl Kisskalt.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Königsberg.)

(Eingegangen am 18. August 1915.)

Bei einer Untersuchung über die Giftigkeit des Quecksilberdampfes habe ich (1912) dem Gedanken Ausdruck gegeben, daß bei Berechnung der Giftigkeit der Gase für Versuchstiere und Übertragung der gewonnenen Resultate auf Individuen anderer Größe (giftige Fabrikgase) die Oberfläche in Betracht gezogen werden müsse, da der Stoffwechsel mindestens von Individuen der gleichen Art proportional der Oberfläche ist und die bei der Atmung aufgenommene Giftmenge vermutlich in enger Beziehung dazu stehen dürfte[1]). — Auch habe ich bei Gelegenheit späterer Versuche[2]) untersucht, ob die tödliche Dosis eines intravenös injizierten Giftes (Blei) mit der Oberfläche zusammenhänge, von dem Gedanken ausgehend, daß der gesamte Stoffwechsel eine Funktion der Oberfläche ist und bei einem intensiveren Stoffwechsel ein Gift eine stärkere Wirkung haben könne; doch fand ich keine Anhaltspunkte, da manchmal kleinere, manchmal größere Tiere schneller der gleichen Dosis erlagen, und habe mich infolgedessen auch nicht weiter darüber geäußert. — Von einem andern Gedanken ausgehend haben Dreyer und Walker (1914) Beziehungen zwischen Giftwirkung und Oberfläche gesucht[3]). Sie nehmen an,

---

[1]) Zeitschr. f. Hygiene 71, 472, 1912.
[2]) Zeitschr. f. Hygiene 78, 500, 1914.
[3]) Proc. Roy. Soc. London Ser. B. 87, 319, 1914.

daß ein Tier relativ um so mehr Blut hat, je kleiner es ist. Gelangt ein Gift in das Blut, so wird es also den Geweben bei kleineren Tieren in verdünnterer Lösung dargeboten werden als bei großen und somit weniger giftig wirken. Sie haben diese Theorie durch Berechnungen von Versuchen mit Diphtherietoxin gestützt und geben an, daß sich an zahlreichen anderen Untersuchungen, darunter an denen von Salant und Rieger[1]), ähnliches nachweisen lasse. Es ist mir jedoch nicht gelungen, aus den Protokollen dieser an zahlreichen Tieren angestellten Versuche einen Beweis für das Dreyersche Gesetz zu erreichen. Im Gegenteil: ordnet man die Tiere nach Überlebenszeiten, so findet man fast bei jeder Tiergruppe die Berechnung nach dem Gewicht genauer als die nach der Oberfläche. Die einzige von Dreyer ziffernmäßig angeführten Versuche anderer Autoren sind die von Moroshima über Arsenik; es sind zwei Reihen von je nur 5 Tieren, von denen die erste Reihe nicht als Beweis seiner Anschauung gelten kann. In einer späteren Arbeit[2]) haben dann Dreyer und Walker die Oberflächendosis zur Überlebenszeit in noch genauere Beziehung zu bringen gesucht.

Ich habe nun bei Versuchen über individuelle Unterschiede der Widerstandsfähigkeit gegen Coffein Gelegenheit gehabt, diese Theorie nachzuprüfen und möchte in folgendem die Resultate mitteilen.

Als Versuchstiere werden Ratten benutzt, die mit Küchenabfällen, von mindestens 3 Tage vor dem Versuch an mit Hafer gefüttert wurden. Einige hatten zu anderen Zwecken längere Zeit vorher magnesiumhaltiges Wasser erhalten, und zwar 0,2 °/₀ Magnesiumchlorid (mit Krystallwasser) dem Trinkwasser zugesetzt; ein Unterschied zeigte sich selbstverständlich nicht; die Tiere sind in der Tabelle mit „Mg“ bezeichnet.

Die Injektion geschah unter allen Kautelen intraperitoneal; bei den gestorbenen und getöteten wurden niemals Zeichen von Infektion oder Verletzung des Darmes gefunden. Intraperitoneal wurde injiziert, damit die Flüssigkeit möglichst schnell und bei allen Tieren gleichmäßig resorbiert wurde. Bei subcutaner

---

[1]) U. S. Dept. of Agriculture Bureau of chemistry Bull. Nr. 148, 1912.

[2]) Diese Zeitschr. 60, 112.

Injektion kann es leicht vorkommen, daß eine Vene angestochen oder daß in derbere Gewebe eingespritzt wird, wodurch die Resorption schneller bzw. langsamer eintritt.

Benutzt wurden Lösungen, die zwischen 33 und 40 g Coffein in 1 l 0,85 % Kochsalzlösung enthielten; die Stärke wurde stets durch Stickstoffbestimmung festgestellt. Diese Mengen lösen sich erst beim Erwärmen (scheiden sich jedoch bei der Abkühlung nicht immer aus). Die großen Tiere erhielten genau 2 ccm, die mittleren 1 ccm, die kleinen 0,6 ccm. Für jede einzelne Injektion wurde die Stammlösung direkt vorher mit der entsprechenden Menge warmer Kochsalzlösung verdünnt. Das Abmessen geschah mit ausgewogenen Pipetten, die sehr genau waren. Die Fehler, die dadurch entstanden, daß ein Tröpfchen der injizierten Flüssigkeit aus der Bauchhöhle zurücktrat, sind äußerst gering; am größten die bei der Injektion gemachten. Alle untersuchten Spritzen waren sehr ungenau und außerdem bewirkt zu weiteres Vorschieben des Spritzenstempels einen in Betracht kommenden Fehler; er ist um so kleiner, je enger die Spritze ist. Bei den verwendeten Spritzen ergab sich aus 30 Wägungen, daß statt 1 ccm im Mittel 0,9209, im Maximum 0,9315, im Minimum 0,9074 ausliefen, also die Zahl 0,9209 als richtig angenommen, ein Fehler von 2,62 % durch die Ungenauigkeit der Injektion entstand. Wenn also z. B. 0,25 mg pro g Körpergewicht injiziert werden sollten, konnten es auch im ungünstigsten Falle nicht mehr als 0,26 und nicht weniger als 0,24 werden. Sämtliche Mischungen und Injektionen habe ich persönlich gemacht.

Durch Vorversuche war festgestellt worden, daß die tödliche Dosis für mittlere Ratten etwa 0,26 mg pro g beträgt. Es wurde daher den Ratten (im ganzen 322 Stück) diese Dosis und etwas größere resp. kleinere injiziert. Es wurden bezeichnet als:

große	Ratten	solche	von	120 g und mehr
mittlere	„	„	„	40 bis 119 g
kleine	„	„	„	weniger als 40 g.

Die Zahlen sind so angegeben, wie sie sich aus der Umrechnung nach dem Fehler der Spritze usw. ergeben haben; nur aus diesem Grunde ist die dritte Dezimale angeführt.

Tabelle I.

	Nr.	Geschlecht	Gewicht	mg pro g	Tod nach Stunden
Versuch I.	1		117	0,230	∞
3. IX. 14.	2		95	"	"
Flüssig-	3		70	"	"
keits-	4		82	"	"
menge	5		76	"	"
1 ccm.	6		98	"	"
Vers. II.	1		84	0,258	∞
8. IX. 14.	2	♂	87	"	1–2
1 ccm.	3	"	80	"	1–2
	4	♀	72	"	6–15
	5	"	68	"	1–2
	6	"	80	"	1–2
Vers. III.	1	♀	82	0,249	$2^1/_2$
11. IX. 14.	2	♂	92	"	∞
In 1 ccm.	3	♀	77	"	"
	4	"	75	"	"
	5	"	82	"	16
	6	"	80	"	2
Vers. IV.	1	♀	225	0,249	$3^1/_2$
14. IX. 14.	2	"	170	"	$4^3/_4$
In 2 ccm.	3	"	175	"	3
	4	"	195	"	6–15
	5	"	167	"	∞
In 1 ccm.	6	♂	60	"	"
	7		40	"	"
	8	♂	50	"	"
	9		35	"	6–15
	10	♀	52	"	∞
Vers. V.	1	♀	175	0,239	$21^1/_2$
18. IX. 14.	2	"	196	"	3
In 2 ccm.	3	"	172	"	$5^1/_2$–$14^1/_2$
	4	"	190	"	$4^1/_2$
	5	"	165	"	5
	6	"	184	"	$3^1/_2$
Vers. VI.	1	♀	81	0,258	∞
18. IX. 14.	2	♂	80	"	$2^1/_2$
In 1 ccm.	3	♀	50	"	$5^1/_2$–$15^1/_2$
	4	♂	52	"	$4^1/_2$
	5	"	40	"	$3^1/_2$
	6	♀	43	"	∞
Vers. VII.	1	♂	44	0,267	$2^1/_2$
21. IX. 14.	2	♀	38	"	3
In 1 ccm.	3	"	44	"	5 Min.
	4	"	43	"	$4^1/_2$
	5	"	42	"	3
	6		42	"	3
	7		43	"	2
	8		38	"	$3^1/_2$

	Nr.	Geschlecht	Gewicht	mg pro g	Tod nach Stunden
Vers. VIII.	1	♀	48	0,271	6–15
24. IX. 14.	2	♂	45	"	"
In 1 ccm.	3	"	45	"	"
	4	♀	48	"	"
	5	"	45	"	$1^1/_2$
Vers. IX.	1	♂	80	0,290	5
5. II. 15.	2	"	80	"	5
In 1 ccm.	3	"	75	"	5
	4	"	58	"	9
	5	"	55	"	7
	6	"	54	"	$6^1/_4$
Vers. X.	1	♂	65	0,280	∞
6. II. 15.	2	"	62	"	12–20
In 1 ccm.	3	"	58	"	"
	4	"	55	"	"
	5	"	51	"	8
	6	"	50	"	7
Vers. XI.	1	♂	48	0,276	∞
II. 15.	2	"	45	"	4
In 1 ccm.	3	"	44	"	$23^1/_2$
	4	"	42	"	12–20
	5	"	40	"	6
	6	"	40	"	∞
	7	"	40	"	9
	8	"	40	"	7
	9	"	40	"	$4^1/_2$
	10	"	40	"	$8^1/_4$
	11	"	42	"	28
	12	"	42	"	12–20
	13	"	58	"	∞
Vers. XII.	1	♂	168	0,265	4
II. 15.	2	"	145	"	$4^1/_2$
In 2 ccm.	3	"	143	"	10
	4	"	135	"	$3^1/_2$
In 1 ccm.	5	"	118	"	12–20
	6	"	115	"	"
	7	"	105	"	∞
	8	"	102	"	"
	9	"	100	"	7
	10	"	82	"	$6^1/_2$
Vers. XIII.	1	♂	275	0,249	12–20
16. II. 15.	2	"	270	0,239	$^1/_2$
In 2 ccm.	3	"	255	0,229	3
	4	"	215	0,218	72
	5	"	210	0,207	∞
	6	"	198	0,197	"
	7	"	185	0,187	"
	8	"	175	0,1765	"

Tabelle I (Fortsetzung).

	Nr.	Geschlecht	Gewicht	mg pro g	Tod nach Stunden
	9	♂	212	0,166	∞
	10	"	250	0,156	"
Vers. XIV.	1	♀	118	0,260	30
24. II. 15.	2	"	110	"	13–22
In 1 ccm	3	"	110	"	9
(Mg).	4	"	120	"	13–22
	5	"	88	"	∞
	6	"	62	"	"
	7	♂	60	"	"
	8	♀	"	"	mager; 4
	9	♂	"	"	∞
Vers. XV.	1	♀	67	0,239	"
26. II. 15.	2	♂	65	"	"
In 1 ccm.	3	♀	60	"	"
(Mg).	4	♂	"	"	"
	5	♀	56	"	"
	6	"	"	"	27
Vers. XVI.	1	♀	120	0,249	∞
1. III. 15.	2	♂	75	"	"
In 1 ccm.	3	♀	108	"	"
	4	"	60	"	"
	5	"	62	"	"
	6	"	52	"	"
	7	♂	42	"	"
	8	♀	40	"	"
	9	"	37	"	"
	10	♂	34	"	"
	11	"	31	"	12–19
	12	♀	27	"	$3^1/_2$
Vs. XVII.	1	♂	33	0,260	∞
3. III. 15.	2	♀	30	0,249	"
In 0,6 ccm.	3	♂	28	0,239	"
	4	"	"	0,229	13–21
	5	♀	"	0,218	13–21
Vs. XVIII.	1	♂	235	0,22	36–45
4. III. 15.	2	"	210	"	48
In 2 ccm.	3	"	178	"	12–21
	4	"	198	"	72
	5	"	185	"	12–21
	6	♀	135	"	48
	7	"	185	"	12–21
	8	"	122	"	∞
	9	"	140	"	36–45
	10	"	150	"	∞
	11	♂	70	0,249	"
	12	"	76	"	"
	13	"	65	0,2285	"
	14	"	45	"	"

	Nr.	Geschlecht	Gewicht	mg pro g	Tod nach Stunden
	15	♀	40	0,2285	∞
	16	"	"	"	"
	17	"	32	"	"
	18	"	30	"	"
	19	"	"	"	"
	20	♂	28	"	"
Vers. XIX.	1	♂	60	0,203	∞
23. III. 15.	2	♀	"	"	"
In 1 ccm.	3	♂	"	"	"
	4	"	"	"	"
	5	"	"	"	"
	6	"	"	0,212	"
	7	"	58	"	"
	8	"	60	"	"
	9	♀	58	"	"
	10	"	60	"	"
	11	♂	63	0,223	"
	12	♀	57	"	"
	13	"	"	"	"
	14	"	"	"	"
	15	"	"	"	"
	16	"	55	0,231	"
	17	♂	"	"	"
	18	♀	"	"	"
	19	"	"	"	"
	20	♂	"	"	"
	21	♀	50	0,243	"
	22	♂	68	"	"
	23	"	62	"	"
	24	♀	53	"	"
	25	"	50	"	"
	26	"	52	0,253	"
	27	♂	"	"	"
	28	♀	"	"	"
	29	"	55	"	"
	30	♂	"	"	"
	31	♀	50	0,264	7
	32	"	"	"	∞
	33	♂	"	"	7
	34	♀	"	"	∞
	35	♂	"	"	"
	36	"	62	0,273	"
	37	♀	"	"	7
	38	♂	"	"	12–20
	39	♀	57	"	∞
	40	♂	40	"	"
	41	"	"	"	"
	42	♀	50	"	7
	43	♂	"	"	∞
	44	♀	92	0,233	8

Tabelle I (Fortsetzung).

	Nr.	Geschlecht	Gewicht	mg pro g	Tod nach Stunden
	45	♂	92	0,233	∞
	46	"	90	"	"
	47	"	75	"	"
	48	"	80	"	"
	49	♀	70	"	"
Vers. XX.	1	♂	48	0,284	8
25. III. 15.	2	♀	"	"	$7\frac{1}{2}$
In 1 ccm.	3	♂	"	"	$5\frac{1}{2}$
	4	"	"	"	$6\frac{1}{4}$
	5	"	"	"	4
	6	"	45	"	3
	7	♂	50	0,294	4
	8	♀	"	"	$4\frac{3}{4}$
	9	♂	"	"	$2\frac{3}{4}$
	10	"	"	"	1
	11	"	"	"	3
	12	♀	"	"	$3\frac{1}{2}$
	13	"	45	0,304	1
	14	"	"	"	$\frac{3}{4}$
	15	"	"	"	4
	16	"	42	"	1
	17	"	43	"	2
	18	♂	"	"	4
	19	♀	55	0,314	$3\frac{1}{4}$
	20	"	"	"	$4\frac{1}{4}$
	21	"	"	"	$3\frac{1}{2}$
	22	♂	"	"	$\frac{3}{4}$
	23	♀	"	"	$\frac{3}{4}$
	24	♂	"	"	$2\frac{1}{2}$
	25	♀	40	0,324	1
	26	"	"	"	40 Min.
	27	"	"	"	8 "
	28	♂	"	"	35 "
	29	♀	"	"	40 "
	30	♂	"	"	$3\frac{3}{4}$ Std.
	31	♀	53	0,334	30 Min.
	32	♂	52	"	30 "
	33	"	55	"	1 Std.
	34	"	53	"	1 "
	35	♀	40	0,344	40 Min.
	36	♂	42	"	49 "
	37	"	"	"	1 St. 25 M.
	38	"	"	"	45 Min.
	39	"	43	"	31 "
	40	♀	"	"	12 "
	41	♂	42	"	34 "
	42	♀	46	0,355	39 "
	43	"	48	"	37 "
	44	♂	43	"	20 "
	45	"	45	"	37 "
	46	♂	40	0,355	20 Min.
	47	♀	42	"	35 "
Vers. XXI.	1	♀	38	0,223	∞
27. III. 15.	2	"	"	"	$4\frac{3}{4}$ Std.
In 0,6 ccm.	3	♂	"	"	12–20
	4	♀	"	"	∞
	5	♂	37	"	"
	6	♀	38	"	"
	7	"	35	0,232	$5\frac{3}{4}$
	8	"	"	"	$8\frac{3}{4}$
	9	"	"	"	4
	10	"	"	"	$11\frac{1}{2}$
	11	♂	"	"	$7\frac{3}{4}$
	12	♀	"	"	9
	13	"	27	0,241	$6\frac{3}{4}$
	14	"	"	"	$5\frac{1}{2}$
	15	"	"	"	12–20
	16	♂	28	"	$7\frac{1}{4}$
	17	♀	"	"	3
	18	♂	"	"	$6\frac{1}{4}$
	19	"	27	0,251	2
	20	"	28	"	$1\frac{3}{4}$
	21	♀	27	"	7
	22	"	25	"	$2\frac{3}{4}$
	23	"	"	"	6
	24	"	30	0,260	$8\frac{1}{4}$
	25	♂	"	"	$8\frac{1}{4}$
	26	"	"	"	$2\frac{3}{4}$
	27	"	"	"	$3\frac{3}{4}$
	28	♀	"	"	6
	29	♂	32	"	$8\frac{3}{4}$
	30	♀	33	0,269	$2\frac{1}{2}$
	31	"	"	"	6
	32	"	35	"	4
	33	"	"	"	3
	34	♂	38	"	$10\frac{3}{4}$
	35		40	0,251	24
	36		35	"	$6\frac{1}{2}$
	37		30	"	3
Vs. XXII.	1	♂	84	0,221	35
8. V. 15.	2	"	"	"	∞
In 1 ccm.	3	"	119	"	"
	4	♀	112	"	"
	5	"	107	0,230	"
	6	♂	95	"	"
	7	"	79	"	13–22
	8		"	"	∞
	9	♂	77	0,240	"
	10	"	"	"	"
	11	"	"	"	13–22

Tabelle I (Fortsetzung).

	Nr.	Geschlecht	Gewicht	mg pro g	Tod nach Stunden
	12	♂	77	0,240	∞
	13	♀	69	0,249	„
	14	„	„	„	26
	15	♂	70	„	$9\frac{1}{2}$
	16	„	„	„	13–22
	17	♀	„	0,258	∞
	18	„	„	„	„
	19	♂	„	„	„
	20	♀	„	„	„
	21	♂	75	0,267	$13\frac{1}{2}$-$22\frac{1}{2}$
	22	♀	69	„	„
	23	♂	82	„	„
	24	„	94	„	$5\frac{3}{4}$
Vs. XXIII.	1	♀	50	0,240	$7\frac{3}{4}$
9. V. 15.	2	♂	52	„	14–23
In 1 ccm.	3	„	57	„	∞
	4	♀	„	„	36
	5	„	59	0,250	10
	6	„	„	„	∞

	Nr.	Geschlecht	Gewicht	mg pro g	Tod nach Stunden
	7	♀	60	0,250	∞
	8	„	64	0,258	„
	9	♂	„	„	14–23
	10	♀	65	„	∞
	11	„	62	0,267	14–23
	12	♂	„	„	„
	13	„	63	„	$11\frac{3}{4}$
	14	♀	67	„	14–23
	15	♂	130	0,203	∞
Meer-	1		557	0,057	∞
schwein-	2		365	0,202	„
chen.	3	♀	303	0,205	„
7. IX. 14.	4	„	317	0,223	6–15
	5	„	348	0,240	6–15
	6	„	302	0,255	3
	7	♂	338	0,285	1
	8	„	302	0,362	20-30 Min.
	9		230	0,419	10-20 „

Die Berechnungen aus der Tabelle I sind im folgenden in 2 Tabellen zusammengestellt. In der ersten ist angegeben, wie groß die Giftdosis nach dem Körpergewicht, in der zweiten wie groß sie nach der Oberfläche berechnet ist. Die Berechnung der letzteren Dosis geschah nach der von Dreyer verwendeten Formel $D = \frac{d}{G^{0,72}}$, wobei d die injizierte Giftmenge, G das Gewicht bedeutet.

Tabelle II. Injizierte

		0,15–	0,16–	0,17–	0,18–	0,19–	0,20–	0,21–	0,22–
Große Tiere 120 g u. mehr	überlebend	1	1	1	1	1	2		2
	tot							1	9
Mittelgroße Tiere 40–119 g	überlebend						5	5	12
	tot								1
	(%)						0%	0%	7,7%
Kleine Tiere	überlebend								8
	tot							1	3
Mäuse	überlebend				1				4
	tot								

Man sieht zunächst aus den Tabellen II und III, daß das Geschlecht keine Rolle spielt. Die Weibchen erliegen dem Gifte nach der gleichen Dosis wie die Männchen, im Gegensatz zu den Angaben Dreyers, daß die Männchen im allgemeinen widerstandsfähiger sind. Allerdings herrschen auch in den Ansichten über das Blutvolum der Ratten gerade bezüglich der Weibchen Unstimmigkeiten, indem es nach Chisolm bis zur Pubertät abnehmen, dann zunehmen soll, was Dreyer, Ray und Walker[1]) niemals beobachtet haben.

Ganz gleichgültig aber, ob man die Verhältnisse der Männchen allein oder beider Geschlechter betrachtet, ergibt sich folgendes: Die drei Altersgruppen verhalten sich in jedem Falle verschieden. Bei Einteilung in noch kleinere Gruppen zeigt sich, daß nur Tiere von 40 bis 70 g die gleiche Widerstandsfähigkeit haben. Es konnte festgestellt werden[2]), daß die mittlere tödliche Dosis für diese 0,2651 mg pro g Körpergewicht mit einer durchschnittlichen Abweichung von 0,014 und einer Streuung von 0,018 beträgt. Bei der Berechnung nach dem Gewicht erscheinen die mittleren Tiere am widerstandsfähigsten; die kleineren etwas, die großen bedeutend weniger. — Bei der Berechnung nach der Oberfläche erscheint die Widerstandsfähigkeit der kleineren Tiere wesentlich geringer, die der großen bedeutender als die der mittleren.

Man sieht also, daß durch die Berechnung nach der Oberfläche die Unterschiede in der Widerstandsfähigkeit nicht wie

[1]) Skandinav. Arch. f. Physiol. 28, 299, 1913.

[2]) Erscheint demnächst in der Zeitschrift für Hygiene.

Menge mg pro g Gewicht.

0,23–	0,24–	0,25–	0,26–	0,27–	0,28–	0,29–	0,30–	0,31–	0,32–	0,33–0,36
7	1 5		5							
24 3 9%	27 10 27%	16 11 40,8%	9 24 72,9%	8 23 74,1%	1 11 91,7%	12 100%	6 100%	6 100%	6 100%	18 100%
5 2	3 9	8	1 8	5						
1 1	5 1	3 1		2		3				

Tabelle III.

Injizierte Menge auf die Oberfläche berechnet.

		0,40–	0,55–	0,60–	0,65–	0,70–	0,75–	0,80–	0,85–	0,90–	0,95–	1,00–	1,05–	1,10–	1,15–	1,20–1,25
Männchen																
große Tiere	überlebend					3	1	1	1	1						
	tot									2	3	2	3	2		1
mittelgroße	überlebend			4	4	9	13	12	4		2					
	tot					2	16	14	16	5	14	5				
kleine	überlebend		1	2	2											
	tot		1	6	5	1										
Mäuse	überlebend	1		1												
	tot		2	1												
Weibchen																
große	überlebend							1		1	1	1	1			
	tot							1	2	2	1	4	3	1		
mittelgroße	überlebend			3	6	11	12	13	8	1						
	tot					4	7	9	15	4	8	4				
kleine	überlebend		2	5	1											
	tot		1	14	2	5										
Mäuse	überlebend	6	4	3												
	tot	1			2	1										

in den von Dreyer angeführten Beispielen vermindert, sondern im Gegenteil noch vermehrt wird.

Immerhin erscheint die Differenz zwischen den mittleren und großen Tieren etwas ausgeglichen. Dies ist aber selbstverständlich; denn selbst wenn das Dreyersche Gesetz nicht richtig ist, muß es vorgetäuscht werden, falls ältere Tiere aus irgendeinem anderen Grunde weniger widerstandsfähig sind, nämlich weil ältere Tiere größer sind und infolgedessen eine relativ kleinere Oberfläche haben. Nun zeigten aber unsere großen Ratten (die etwa $1^1/_2$ bis 2 Jahre alt waren) schon Alterserscheinungen, wie struppige Haare. Es ist daher ebenso wahrscheinlich, daß ältere Tiere infolge geringer Widerstandsfähigkeit des Herzens oder aus anderen Ursachen weniger widerstandsfähig sind als mittlere.

Gänzlich versagt dieses Oberflächengesetz bei den jungen Tieren. Hier ist die geringere Widerstandsfähigkeit nach beiden Berechnungen festgestellt. Es ergibt sich auch daraus, wie falsch die Anschauung[1]) ist, daß die Maximaldosen allein nach den Oberflächen angegeben werden können.

Übrigens kommt die anscheinend verschiedene Disposition der Lebensalter auch nicht dadurch zustande, daß durch die injizierte Flüssigkeitsmenge die Blutmenge in verschiedener Weise vermehrt wurde, wie sich aus einem Vergleich mit Chisolms Zahlen über das Blutvolum der Ratten ergibt.

Man könnte nur noch annehmen, daß kleine Tiere aus anderen Gründen so sehr empfindlich sind, daß hier die Beziehungen der tödlichen Dosis zur Oberfläche zurücktreten und sie aus der Betrachtung ausfallen müssen. Da aber an Extremen die Richtigkeit solcher Gesetze bekanntlich am besten geprüft werden kann, wurden auch weiße Mäuse als ein gewisser Ersatz für ganz kleine Ratten injiziert, wenn auch zugegeben werden muß, daß Vergleiche verschiedener Tierarten nur cum grano salis gemacht werden dürfen. Die Versuchsergebnisse sind ebenfalls in den Tabellen I, II und III eingetragen. Man sieht daraus, daß bei Berechnung nach dem Gewicht die tödliche Dosis für Mäuse etwa die gleiche ist, wie für erwachsene

---

[1]) Proc. Roy. Soc. London Ser. B, 87, 319, 1914.

(mittlere) Ratten. Dies spricht also für die Berechnung nach dem Gewichte. Bei Berechnung nach der Oberfläche erscheinen sie wesentlich empfindlicher, doch lassen sich daraus weiter keine Schlüsse gegen das Dreyersche Gesetz ziehen, da sie auch als Arteigentümlichkeit weniger Blut haben [1]).

Auch die eingehenden Untersuchungen von Falck [2]) über Strychnin stehen im Widerspruch mit der Ansicht Dreyers Hier zeigt sich allerdings, daß die tödliche Dosis des Strychnins bei Kaninchen, auf das Gewicht berechnet, mit zunehmendem Alter (und Gewicht) abnahm. Auf die Oberfläche berechnet, sind Unterschiede ebenfalls noch vorhanden, wenn auch geringer. Ganz anders aber, wenn auf die minimale krampferregende Dosis geachtet wird. Sie nimmt mit zunehmendem Alter zu, dann ab und erreicht bei älteren Tieren dieselbe Höhe wie bei neugeborenen. Als Ursache fand Falck, daß ältere Tiere nicht gegen das Strychnin an sich, sondern gegen die Erstickung, auch wenn sie auf anderem Wege hervorgerufen wird, empfindlicher sind. — Es kann also hier die Deutung in keiner Weise in Betracht kommen, daß der Tod bei schwereren Tieren deshalb schneller eintritt, weil das Gift in stärkerer Lösung in den Blutgefäßen zirkuliert. — Die Widerstandsfähigkeit der Mäuse gegen Strychnin geht in keiner Weise nach dem Oberflächengesetz, sondern nimmt sowohl gegen die krampferregende als gegen die tödliche Dosis erst zu, dann ab.

---

[1]) Philosoph. Transact. Roy. Soc. London Ser. B, **201**, 133, 1910; **202**, 191, 1911.

[2]) Falck, Arch. f. d. ges. Physiol. **34**, 525, 1884; **36**, 285, 1885.

Über Strahlenwirkung auf Kolloide.

Von

Walther Löb.

(Aus der biochem. Abteil. des Virchow-Krankenhauses zu Berlin.)

(Eingegangen am 2. September 1915.)

Einige Beobachtungen und Angaben von Fernau und Pauli[1]) über die Einwirkung der durchdringenden Radiumstrahlung auf Kolloide veranlassen mich, auf meine vor einiger Zeit[2]) gemeinsam mit Sato veröffentlichten Versuche über Elektrokultur zurückzukommen. Einige merkwürdige in jener Arbeit beschriebene Erscheinungen stehen offenbar mit einzelnen Erfahrungen von Fernau und Pauli in nahem inneren Zusammenhang. Es handelt sich um die an Eiweißlösungen auftretenden Zustandsänderungen, die bereits ohne sichtbare Koagulation auf anderm Wege feststellbar sind. Wenn auch die von mir gewählte Bestrahlungsform, die stille Entladung, der Radiumstrahlung nicht ohne weiteres vergleichbar ist, so weist sie doch in mancher Beziehung Verwandtschaft zu ihr auf. Gerade die Gleichartigkeit der Wirkungen in einem Punkte eröffnet die Möglichkeit einer gleichartigen Ursache, die bei beiden Strahlenarten vielleicht in der Entsendung von negativen Elektronen zu suchen ist.

Die von Fernau und Pauli beobachteten Tatsachen sind die folgenden: Lösungen von nativem Albumin zeigen nach Radiumbestrahlung, die noch nicht bis zur sichtbaren Ausflockung geführt hat, erheblich gesteigerte Hitzegerinnbarkeit. Bei achttägiger Bestrahlung einer durch Neutralsalzzusatz klar gebliebenen Probe ist die Herabminderung der Gerinnungs-

[1]) Diese Zeitschr. 70, 426, 1915.

[2]) Diese Zeitschr. 69, 1, 1915.

temperatur ungemein stark. Auch die Alkoholfällbarkeit des Albumins wird durch die Bestrahlung bedeutend gefördert.

Über das Wesen der Zustandsänderung äußern die Verfasser vermutungsweise, daß Beziehungen zu der durch Hitze erfolgenden Denaturierung unverkennbar sind.

Bei meinen in der erwähnten Arbeit ausgeführten Untersuchungen über die Beeinflussung der Enzymreaktionen durch die stille Entladung wurde gefunden, daß die Entladung auf kolloidale Lösungen ausflockend wirkt. Bei den Versuchen mit Stärke zeigte sich, daß sich die Zustandsänderung vor dem Sichtbarwerden durch ihr chemisches Verhalten bemerkbar macht. Stärke, die der Entladung ausgesetzt, aber nicht vollständig hydrolysiert war (indem bei reichlicher Stärkekonzentration die Entladung nicht annähernd bis zur beendigten Hydrolyse durchgeführt wurde), wird weit langsamer durch Diastase gespalten, als es vor der Entladung der Fall war (l. c. S. 17). Zur Deutung dieser Erscheinung wurde angenommen, daß ein Einfluß der Teilchengröße auf die Reaktionsgeschwindigkeit im heterogenen System vorliegt. Die durch Vergrößerung der kolloiden Partikelchen der Stärke geschaffene Oberflächenverkleinerung setzt die Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber dem Enzym herab. Die Stärke in diesem diastatisch trägeren Zustand würde danach eine Zwischenform zwischen der ursprünglichen löslichen Stärke und der sichtbar ausgeflockten bedeuten. Auch Caseinlösungen wurden durch die stille Entladung bis zur freilich geringfügigen Ausflockung verändert.

Nach den an der Stärke gemachten Beobachtungen sind also die durch wirksame Bestrahlung erzielbaren Zustandsänderungen in der Lösung nicht auf Eiweißlösungen beschränkt. Wenn es mir auch fern liegt, die mit der stillen Entladung gewonnenen Erfahrungen zu verallgemeinern, so scheint es mir doch, daß sie im Zusammenhang mit den Beobachtungen von Fernau und Pauli auf Beziehungen hinweisen, die zur Aufklärung der biologischen Strahlenwirkung und der noch vollkommen ungeklärten Strahlentherapie von Bedeutung werden können.

Untersuchungen über die Verbrennung in den Lungen und einige Bemerkungen über die Bestimmung der Gase des Blutes.

Von

V. Henriques.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Universität Kopenhagen.)

(Eingegangen am 11. September 1915.)

In einem früheren Aufsatz in dieser Zeitschrift[1]) habe ich dargetan, daß der von Bohr und mir[2]) vermutete Verbrennungsprozeß in den Lungen sicherlich nicht in dem Umfange stattfindet, wie wir ursprünglich annahmen, und ich sprach damals aus: „Ob überhaupt in der Lunge eine Verbrennung stattfindet, läßt sich noch nicht mit Sicherheit entscheiden.“ Kurz vor dem Erscheinen meines Aufsatzes teilten Evans und Starling[3]) eine Reihe interessanter Versuche mit, aus denen sie folgern zu können glaubten, daß eine Verbrennung der von Bohr und mir vermuteten Art überhaupt nicht stattfindet. Im Anschluß an meine früheren Versuche über die Verteilung des Blutes vom linken Herzen zwischen dem Herzen und dem übrigen Organismus habe ich eine Reihe von Versuchen angestellt, um über die vermutete Lungenverbrennung größere Klarheit zu gewinnen, aber bevor ich zur näheren Besprechung dieser Versuche übergehe, werde ich erst eine Reihe von Bestimmungen der Gase im Blute mitteilen, die ausgeführt wurden, um zu untersuchen, mit welcher Genauigkeit solche Bestimmungen sich durchführen lassen.

In Abderhaldens Handbuch der biochemischen Methoden hat Franz Müller eine Darstellung der Genauigkeit gegeben,

[1]) Diese Zeitschr. 56, 1913.

[2]) Arch. de Physiol. 1897.

[3]) Journ. of physiol. 46, 1913.

mit der solche Bestimmungen sich teils bei der Anwendung der Quecksilberluftpumpe, teils bei der Befolgung von Haldane-Barcrofts Methode durchführen lassen.

Bei allen von mir ausgeführten Versuchen wurden die Quecksilberluftpumpe und die Gasanalyse nach Pettersson angewandt, und in betreff der näheren Details brauche ich nur teils auf Bohrs und meine frühere Arbeit, teils auf Bohrs Darstellung in R. Tigerstedts Handbuch der physiologischen Methodik Bd. II, 1 zu verweisen. Die von mir angewandten Blutrezipienten waren cylindrisch, mit einem Volumen von ca. 20 ccm. Ferner wurde bei allen Probeentnahmen dafür Sorge getragen, daß die Rezipienten sich gleichzeitig füllten, indem die mit den Quecksilberrezipienten durch einen Schlauch verbundenen Quecksilberbehälter an einer und derselben Schnur gesenkt wurden, die mittels eines kleinen Motors langsam an einer kleinen Achse herabgerollt wurde.

Bei einer Untersuchung der Genauigkeit, mit der die Gase des Blutes sich bestimmen lassen, ist es von sehr großer Bedeutung, ob man das Blut direkt einem Gefäß (oder dem Herzen) entnimmt, oder ob man das Blut in einer Schüssel hat und von hier aus die Rezipienten füllt. In letzterem Falle kann man eine weit größere Genauigkeit erzielen als in ersterem. Daß man durch die Benutzung von Oxalatblut oder defibriniertem Blut eine gute Genauigkeit erzielen kann, geht aus dem folgenden hervor.

Einem Hund wird aus der Carotis Blut entnommen, das in ein Glas mit Calciumoxalat strömt. Das Blut wird in einer Schüssel angebracht, und indem mit einer Glasspatel fortwährend im Blute umgerührt wird, so daß eine Fällung der Blutkörperchen nicht stattfinden kann, werden gleichzeitig 3 Proben in Rezipienten entnommen. Nach einer Auspumpung und Analyse wurden folgende Zahlen gefunden (alle Zahlen bedeuten: ccm Gas in 100 ccm Blut bei $0^0 = 760$ mm):

Versuch 1.

	CO_2	O_2	N_2
Probe 1	31,70	16,11	1,16
„ 2	31,64	16,02	1,15
„ 3	31,65	16,06	1,16.

Versuch 2.

	CO_2	O_2	N_2
Probe 1	33,88	16,12	1,05
„ 2	33,81	16,09	1,09
„ 3	33,93	16,16	1,05

Aus den hier angeführten Zahlen erhellt, daß eine Auspumpung der Gase des Blutes mit nachfolgender Analyse sich mit einer recht großen Genauigkeit durchführen läßt, notabene wenn man imstande ist, die zusammengehörenden Proben in der Weise zu entnehmen, daß man versichert sein kann, in allen Rezipienten vollständig einheitliches Blut vor sich zu haben. Dies ist, wie oben erwähnt, möglich, wenn man die Blutproben aus einem Glase nimmt, in dem das Blut während der Probeentnahme fortwährend mittels einer Rührspatel gemischt wird.

Ganz anders stellt sich der Versuch, wenn es sich darum handelt, Blutproben aus einem Gefäß zu nehmen, und man die Proben im Laufe mehrerer Minuten langsam entnimmt. Hier spielt es nämlich eine wesentliche Rolle, daß die Blutkörperchen Zeit haben, in der Leitung vom Gefäß bis zum Blutrezipienten zu Boden zu sinken. Ist die Leitung ganz kurz, wird die Fällung der Blutkörperchen eine etwas geringere Rolle spielen, als wenn die Leitung lang ist; in der Regel, und namentlich wo es sich darum handelt, mittels eines Katheters durch die Vena jugularis dem rechten Herzen Blut zu entnehmen, ist man genötigt, recht lange Leitungen anzuwenden. Ein die Fällung der Blutkörperchen noch begünstigendes Moment ist die Injektion von Hirudin, die bei der Blutprobeentnahme aus lebenden Tieren absolut notwendig ist. Wenn man einem Hund Hirudin injiziert und darauf nach ca. 15 Minuten eine Blutprobe in ein Cylinderglas entnimmt, wird man beobachten, daß die Blutkörperchen sich im Laufe von ganz kurzer Zeit so viel herabgesenkt haben, daß sich oberhalb derselben eine klare Schicht von Plasma befindet. Es fand sich daher auch in der Regel eine recht hohe Plasmaschicht in den Blutrezipienten, bevor das Blut in die Pumpe übertragen worden war. Wenn man, wie es bei der von mir angewandten Technik der Fall ist, den Inhalt des ganzen Rezipienten in die Pumpe entleert, wird diese Senkung der Blutkörperchen im Rezipienten für die Bestimmung der Gasmenge im Blut keine Rolle spielen;

dagegen wird selbstverständlich die stark vermehrte Neigung der Blutkörperchen zu einer Senkung in den Leitungen nach Injektion von Egelinfus von sehr großer Bedeutung sein und die Probeentnahme längere Zeit hindurch erschweren, wenn es sich darum handelt, eine tatsächliche Durchschnittsprobe des strömenden Blutes zu erhalten. Daß dieses Verhältnis, das bisher kaum genügend beachtet worden ist, eine große Rolle spielt, erhellt deutlich aus der großen Anzahl von mir ausgeführter Versuche, bei denen ich denselben Gefäßen 2 oder bisweilen 3 Proben entnommen habe. So gute Übereinstimmungen, wie oben angeführt, erzielt man nur ganz ausnahmsweise. Ich werde hier nicht alle gefundenen Zahlen mitteilen, sondern mich damit begnügen, anzuführen, daß man mitunter — auch wo die Stickstoffzahlen gut übereinstimmen, so daß von einer Undichtheit der Pumpen keine Rede ist — in 3 gleichzeitig entnommenen Proben sowohl in betreff der Kohlensäure als in betreff des Sauerstoffes Verschiedenheiten vorfindet, die ca. 0,5 ccm pro 100 ccm Blut betragen können[1]). Es ist einleuchtend, daß Fehler einer solchen Größe von großer Bedeutung sein werden, wo es sich darum handelt, die durch Analyse der Exspirationsluft bestimmten respiratorischen Quotienten mit den durch eine Analyse des Gases im Blute aus bzw. dem rechten und dem linken Herzen bestimmten zu vergleichen.

Ein seinerzeit u. a. von Zuntz gegen die von Bohr und mir angestellten Versuche über die Verbrennung in den Lungen erhobener Einwand war es, daß die im rechten Ventrikel entnommene Blutprobe nicht dem in die Pulmonale ausströmenden Blut zu entsprechen brauchte; nach Zuntz' Ansicht lag die Möglichkeit vor, daß das Blut aus der Vena cava sup., Vena cava inf. und Vena magna cordis im rechten Ventrikel noch teilweise gesondert gehalten werden könne. Wenn dies der Fall ist, wird eine Blutprobe aus dem rechten Herzen nicht dem zur Lunge strömenden Blut entsprechen, und das Resultat

[1]) Eine erschöpfende Darstellung der Genauigkeit der Bestimmung der Gase im Blute ist, wie oben angeführt, von Franz Müller in Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden gegeben worden. Da die von Müller angeführten Zahlen allenfalls teilweise durch Untersuchung von defibriniertem Blut gewonnen worden sind, sind die gefundenen Differenzen im Vergleich mit den von mir gefundenen als sehr bedeutend zu betrachten.

des Versuches müßte dann irreleitend sein. Da der von Zuntz angeführte Einwand, wenn er richtig ist, die ganze benutzte Versuchsmethode unanwendbar machen müßte, habe ich versucht, dem rechten Herzen und der Arteria pulmonalis gleichzeitig Blut zu entnehmen, um zu untersuchen, ob zwischen dem an diesen beiden Stellen entnommenen Blut ein wesentlicher Unterschied bestehe. Die Versuche wurden an Hunden ausgeführt. Nach Morphininjektion und Curareinjektion oder Durchschneidung der Medulla oblongata mit nachfolgender künstlicher Respiration wurde der Thorax geöffnet, ein Katheter wurde durch die Vena jugularis in den rechten Ventrikel eingeführt, die Blutprobe aus der Pulmonale wurde durch einen Troikart entnommen, der durch die Arterienwand hineingestoßen wurde, woraus die Mündung des Troikarts der Teilungsstelle der Arterie entsprechend hinaufgeführt wurde; es wurden demnach in gewöhnlicher Weise gleichzeitig aus den zwei Stellen Blutproben entnommen. In der Regel wurde ferner aus der Arteria femoralis eine Blutprobe entnommen und während der Probeentnahme ein Respirationsversuch angestellt.

Versuch 3.

Hund. Gewicht 9,4 kg. Morphin. Durchschneidung der Medulla oblongata. Egelinfus.

A. Respirationsversuch 4 Minuten. Gleichzeitige Probeentnahme aus dem rechten Herzen, der Arteria pulmonalis und der Arteria femoralis.

Der respiratorische Quotient 0,82 ($CO_2 = 2,55\,^0/_0$, O_2 Defizit $= 3,12\,^0/_0$).

In 100 ccm Blut aus:	CO_2	O_2	N_2	$\frac{CO_2}{O_2}$
dem rechten Herzen	51,09	5,06	1,34	0,89
der Arteria pulmonalis . . .	50,77	5,44	1,20	0,89
der Arteria femoralis	40,40	17,11	1,28	—

Der Unterschied der Zahlen des rechten Herzens und der Arteria pulmonalis ist für $CO_2 = 0,33$ und für $O_2 = 0,38$, welche Werte als innerhalb der Fehlergrenze liegend zu betrachten sind. Die aus den gefundenen Zahlen für die Gase des Blutes berechneten resp. Quotienten sind 0,89, was mit dem beim Respirationsversuche gefundenen 0,82 recht gut übereinstimmt.

B. Eine neue Blutprobeentnahme im Laufe von 4 Minuten ergab:

In 100 ccm Blut aus:	CO_2	O_2	N_2
dem rechten Herzen	48,50	3,46	0,86
der Arteria pulmonalis . . .	48,25	3,77	1,05
der Arteria femoralis	37,77	14,28	1,18

Der Unterschied der Zahlen des rechten Herzens und der Arteria pulmonalis ist für $CO_2 = 0,25$ und für $O_2 = 0,31$, was innerhalb der Fehlergrenze liegt.

Versuch 4.

Hund. Gewicht 21 kg. Morphin. Durchschneidung der Medulla oblongata. Egelinfus. Kanüle in das rechte Herz und die Arteria femoralis, sowie Stechkanüle in die Arteria pulmonalis.

Respirationsversuch 4 Minuten. Gleichzeitige Blutprobeentnahme.

Der resp. Quotient war 0,73 ($CO_2 = 4,35\,^0/_0$, Sauerstoffdefizit $= 5,95\,^0/_0$).

In 100 ccm Blut aus:	CO_2	O_2	N_2	$\frac{CO_2}{O_2}$
dem rechten Herzen	53,07	5,65	1,11	0,77
der Arteria pulmonalis	53,30	5,62	1,09	0,80
der Arteria femoralis	47,72	12,61	1,38	

Der Unterschied zwischen den Zahlen der Gasmenge aus dem rechten Herzen und der Art. pulmonalis ist für $CO_2 = 0,23$ und für $O_2 = 0,03$ und für $N_2 = 0,02$. Die Übereinstimmung ist als eine ausgezeichnete zu betrachten. Der aus den Werten für das rechte Herz (0,77) berechnete respiratorische Quotient stimmt einigermaßen mit dem bei dem Respirationsversuche gefundenen Quotienten 0,73 überein; weniger gut stimmt der aus den Zahlen für die Art. pulmonalis berechnete Quotient 0,80.

Versuch 5.

Hund. Gewicht 16,5 kg. Morphin. Curare. Egelinfus. Im übrigen dasselbe Verfahren wie oben, doch war bei diesem Versuch in die Aorta, so wie früher von Bohr und mir beschrieben, eine Stromuhr eingeschaltet. Da das Resultat des Stromuhrversuches durchaus mit unseren früheren Resultaten übereinstimmt, soll dieser Versuch hier nicht näher besprochen werden. Die Dauer des Versuches betrug 2 Minuten, der resp. Quotient war 0,80 ($CO_2 = 3,07\,^0/_0$; O_2-Defizit $= 3,82\,^0/_0$).

In 100 ccm Blut aus:	CO_2	O_2	N_2	$\frac{CO_2}{O_2}$
dem rechten Herzen	52,03	5,61	0,93	0,92
der Arteria pulmonalis	52,14	5,08	0,97	0,85
der Arteria femoralis	47,42	10,63	1,67	

Der Unterschied der Kohlensäuremenge des Blutes aus dem rechten Herzen und der Art. pulmonalis ist 0,11, während der Unterschied in betreff des Sauerstoffes bedeutend größer ist, nämlich 0,53; doch grenzt diese Differenz direkt an den Versuchsfehler. Der durch den Respirationsversuch bestimmte respiratorische Quotient ist 0,80. Die entsprechenden Quotienten des rechten Herzens und der Arteria pulmonalis sind 0,92 und 0,85, die Übereinstimmung ist in betreff des rechten Herzens weniger gut.

Versuch 6.

Hund. Gewicht 14 kg. Morphin. Curare. Egelinfus. Katheter ins rechte Herz, sowie Stechkanüle in die Arteria pulmonalis. Es werden gleichzeitig an jeder Stelle 2 Proben entnommen, und die 3 Minuten dauernde Probeentnahme findet bei allen Proben in ganz derselben Weise statt, indem die, wie oben erwähnt, mit den Blutrezipienten in Verbindung stehenden Quecksilberbehälter an einer alle 4 Behälter tragenden Schnur herabgelassen werden.

In 100 ccm Blut aus:	CO_2	O_2	N_2
dem rechten Herzen I	50,39	6,97	1,08
„ „ „ II	50,14	7,07	0,99
der Arteria pulmonalis I . . .	50,28	7,15	1,14
„ „ „ II . . .	50,39	7,21	1,07

Der größte Unterschied der 4 Werte von CO_2 ist 0,25, von $O_2 = 0,24$ und von $N_2 = 0,13$. Die mittleren Zahlen der beiden Bestimmungen bzw. aus dem rechten Herzen und der Arteria pulmonalis sind:

Rechtes Herz: $CO_2 = 50,27$; $O_2 = 7,02$; $N_2 = 1,04$
Arteria pulmonalis: $CO_2 = 50,34$; $O_2 = 7,18$; $N_2 = 1,11$

was — in Anbetracht der vielen möglichen Versuchsfehler — eine sehr gute Übereinstimmung bezeichnet.

Ich meine daher, daß man berechtigt ist, aus den angeführten Versuchen zu folgern, daß das mit einem Katheter dem rechten Ventrikel entnommene Blut die gleiche Zusammen-

setzung aufweist wie das in die Arteria pulmonalis strömende Blut, oder mit anderen Worten: das Blut aus dem rechten Ventrikel hat dieselbe Zusammensetzung wie das in die Lungen einströmende Blut.

Wie oben erwähnt, haben Evans und Starling durch eine Reihe von interessanten Untersuchungen dartun zu können geglaubt, daß eine Verbrennung in den Lungen, wie Bohr und ich sie annahmen, nicht stattfindet. Die in diesem Aufsatz mitgeteilten Untersuchungen sind angestellt worden, bevor Evans und Starling ihre Versuche veröffentlichten; besonderer Umstände wegen werden sie erst jetzt mitgeteilt; wenn meine Versuche auch für die Nichtexistenz einer Lungenverbrennung keinen absoluten Beweis abgeben, so meine ich doch, daß sie für die Lösung der Frage von gewissem Interesse sind. Während Evans und Starlings Versuche mit einem „Herz-Lungenpräparat" durch Injektion von Erstickungsblut in das System ausgeführt wurden, sind die unten angeführten Versuche unter mehr normalen Verhältnissen angestellt worden. Die Versuche wurden an Hunden ausgeführt, und zwar nach folgendem Verfahren:

Nach einer Injektion von Morphin und Curare wird eine künstliche Respiration eingeleitet; die Menge der Exspirationsluft wird an einer Gasuhr bestimmt, und es werden der Exspirationsluft Durchschnittsproben zur Bestimmung von CO_2- und O_2-Gehalt entnommen. Durch die Vena jugularis wird ein Katheter in den rechten Ventrikel hinabgeführt, dem eine Probe des zur Lunge strömenden Blutes entnommen wird. Die Zusammensetzung des aus der Lunge strömenden Blutes wird in der Weise bestimmt, daß der Arteria femoralis dextra, in die eine ⊥-Kanüle eingeführt wird, durch die fortwährend Blut strömt, eine Blutprobe entnommen wird. Gleichzeitig mit einem Respirationsversuch werden nun dem rechten Herzen und der Arteria femoralis Blutproben entnommen, und zwar stets je zwei Blutproben an jeder Stelle; diese Proben werden unmittelbar nach dem Versuche mittels vier Quecksilber-Luftpumpen ausgepumpt. Vor der Einführung der verschiedenen Kanülen ist durch die Vena jugularis Egelinfus injiziert worden.

Diese Bestimmungen reichen indessen nicht hin, um zu entscheiden, ob in der Lunge eine Verbrennung stattfindet. Man muß außerdem wissen, wie groß die Blutmenge ist, die während der Versuchszeit die Lungen passiert hat. In unseren früheren Versuchen wurde diese Menge an einer in die Aorta eingeschalteten Stromuhr bestimmt, und das durch die Coronararterien passierende Blut wurde auf 30 ccm Blut pro 100 g Herz pro Minute berechnet. Aus Evans und Starlings und meinen eigenen Untersuchungen geht indessen hervor, daß dieser von Bohr und mir für die Blutmenge durch die Coronararterien berechnete Wert viel zu gering ist.

Eine Stromuhr läßt sich somit nicht benutzen, es sei denn, daß es möglich wäre, die Stromuhr in die Arteria pulmonalis statt in die Aorta einzuschalten. Ich habe dies zu wiederholten Malen versucht, es wollte mir aber nicht gelingen, derartige Versuche durchzuführen, wahrscheinlich weil die Kraft des rechten Ventrikels zu gering ist, um das Blut gegen den vielfach gesteigerten Widerstand durchzutreiben. Ich bin deshalb dazu übergegangen, die durch die Lungen passierende Blutmenge mittels der von mir früher beschriebenen Modifikation von Stuarts Methode zu bestimmen. Das Verfahren besteht in einer Injektion einer bestimmten Menge einer Rhodannatriumlösung in den linken Ventrikel und darauffolgender Probeentnahme von Blut aus einer ⊥-Kanüle, die in die Arteria femoralis eingeführt ist. In betreff der näheren Details der Methode verweise ich auf meinen früheren Aufsatz in dieser Zeitschr. 56, 230, 1913.

Um eine solche Bestimmung auszuführen, muß also ein feiner Katheter in den linken Ventrikel eingeführt werden; da die Injektion vor der Abzweigung der Coronararterien stattfindet, werden die gefundenen Werte der ganzen, aus dem linken Ventrikel ausströmenden Blutmenge entsprechen, d. h. der Blutmenge, die die Lungen passiert. Diese Methode bietet jedoch gewisse Unannehmlichkeiten. Während man an einer Stromuhr fortwährend die Strömungsgeschwindigkeit während des Respirationsversuches und der Blutprobeentnahme verfolgen kann, ist man bei der Injektionsmethode darauf hingewiesen, die Strömungsgeschwindigkeit unmittelbar vor (eventuell unmittelbar nach) dem Respirationsversuch zu bestimmen und

davon auszugehen, daß die Strömungsgeschwindigkeit sich in den 3 darauffolgenden Minuten, in denen der eigentliche Versuch angestellt wird, nicht verändert. Trotz dieses Mangels der angewandten Methode meine ich doch, daß sie anwendbar ist, namentlich wenn es gelingt, die Strömungsgeschwindigkeit sowohl vor als nach dem eigentlichen Versuch zu bestimmen und man dann die mittlere Zahl der beiden Bestimmungen benutzt.

Versuch 7.

Hund. Gewicht 21 kg. Cor = 139 g. Morphin, Curare. Künstliche Respiration. Egelinfus. Ein Katheter wird in den rechten und den linken Ventrikel hinabgeführt. Eine Durchlaufskanüle wird in beide Art. femorales eingeführt.

Um 1^h 45′ wird die Geschwindigkeit des Blutstroms durch Injektion von Rhodannatrium in den linken Ventrikel zu 1806 ccm in 3 Minuten bestimmt (eine Probe nach dem Respirationsversuch ging verloren). Von 1^h 46′ bis 1^h 49′ Respirationsversuch sowie Blutprobeentnahme.

Der Respirationsversuch ergab folgende Zahlen (bei 0° = 760 mm in 3 Minuten):

CO_2 = 250,3 ccm; O_2 = 238,8 ccm; resp. Quotient = 1,05.

Die Analyse der Gase des Blutes ergab:

In 100 ccm Blut aus:	CO_2	O_2	N_2
dem rechten Herzen I	44,27	2,74	1,14
„ „ „ II	44,41	2,73	1,09
der Arterie I	31,61	15,19	1,10
„ „ II	31,49	15,31	0,99

Die mittleren Zahlen der beiden Bestimmungen sind:

rechtes Herz . . CO_2 = 44,34; O_2 = 2,74;
Arteria . . . . CO_2 = 31,55; O_2 = 15,25.

Der aus dem Blute berechnete respiratorische Quotient ist 1,02; er stimmt gut mit dem durch den Respirationsversuch gefundenen 1,05 überein. Berechnet man den Stoffwechsel aus den gefundenen Werten der Gase des Blutes in Verbindung mit dem gefundenen Wert der Geschwindigkeit des Blutstroms, und vergleicht man das Resultat mit dem bei dem Respirationsversuch gefundenen, so hat man für 3 Minuten:

Respirationsversuch:

$CO_2 = 250{,}3$ ccm; $O_2 = 238{,}8$ ccm; $\frac{CO_2}{O_2} = 1{,}05$;

aus dem Blut berechnet:

$CO_2 = 231{,}0$ ccm; $O_2 = 225{,}9$ ccm; $\frac{CO_2}{O_2} = 1{,}02$.

Differenz: $CO_2 = 19{,}3$ ccm (7,7 %); $O_2 = 12{,}9$ ccm (5,4 %).

Der Unterschied beträgt in betreff der Kohlensäure 7,7 % des beim Respirationsversuche gefundenen Wertes und in betreff des Sauerstoffes 5,4 %; in Anbetracht der großen Schwierigkeiten bei der Durchführung derartiger Versuche muß die Übereinstimmung zwischen den gefundenen Werten als überaus gut bezeichnet werden.

Versuch 8.

Hund. Gewicht 22 kg. Herz 168 g. Morphin. Curare. Egelinfus. Künstliche Respiration. Kanülen wie im vorigen Versuch angebracht.

A.

Respirationsversuch um $10^h 35'$. Gasuhr (unkorr.) = 16,61 l. % CO_2 = 2,03, % O_2 Defizit = 2,37. CO_2 ausgeschieden = 305,4 ccm; O_2 aufgenommen = 356,6 ccm; respiratorischer Quotient = 0,86; Blutdruck während des Versuches = 35 mm.

In 100 ccm Blut aus:	CO_2	O_2	N_2
der Arterie I	31,72	23,19	0,94
„ „ II	31,85	23,41	1,14
dem rechten Herzen I	42,85	9,45	1,23
„ „ „ II		verloren	

Mittlere Zahlen für die Arterie:

$$CO_2 = 31{,}79;\quad O_2 = 23{,}30;\quad \text{respir. Quotient} = \frac{11{,}06}{13{,}85} = 0{,}80.$$

Eine Rhodannatriuminjektion 1 Minute vor und 1 Minute nach dem Versuch ergab eine Strömungsgeschwindigkeit für $3^1/_4$ Minuten von:

vor dem Versuch = 2835 ccm; nach dem Versuch = 2686 ccm; im Mittel = 2761 ccm.

Berechnen wir den respiratorischen Stoffwechsel aus den Gasen des Blutes und der Strömungsgeschwindigkeit, erhalten wir:

$CO_2 = 305{,}4$ ccm; $O_2 = 382{,}4$ ccm.

Eine Zusammenstellung der gefundenen Zahlen ergibt folgendes Versuchsresultat:

Stoffwechsel bestimmt durch:	CO_2	O_2
Respirationsversuch . . .	305,4	356,6
die Gase des Blutes . . .	305,4	382,4
Differenz	0	÷ 25,8

Die gefundenen Werte der Kohlensäure sind einander in den beiden Versuchen ganz gleich; der Sauerstoffwert des Blutes ist, wenn er aus dem Gase des Blutes und der Strömungsgeschwindigkeit bestimmt wird, 7,2 % höher als der durch den Respirationsversuch bestimmte Wert. Selbstredend kann der aus den Gasen des Blutes berechnete Stoffwechsel nie höher sein als der durch den Respirationsversuch bestimmte. Der gefundene Unterschied ist indessen so klein, daß man aus diesem Versuch wie aus dem vorhergehenden folgern muß, daß in der Lunge keine Verbrennung stattgefunden hat.

B.

Um $11^h 29'$ wurde mit demselben Versuchstier ein neuer Versuch angestellt. — Versuchsdauer = $3^1/_2$ Minute; Gasuhr = 17,53 l; % CO_2 = 2,29; % O_2 Defizit = 2,25; der Blutdruck während des Versuches = 55 mm.

CO_2 ausgeschieden = 363,6 ccm; O_2 aufgenommen = 357 ccm; respiratorischer Quotient = 1,02.

In diesem Versuch wurden dem Blut nur einzelne Proben entnommen.

In 100 ccm Blut aus:	CO_2	O_2	N_2
dem rechten Herzen . . .	45,67	11,10	0,96
der Arterie	34,05	23,64	1,06

$$\frac{CO_2}{O_2} = \frac{11,62}{12,54} = 0,93.$$

Die 1 Minute vor dem Versuch in $3^1/_2$ Minuten bestimmte Strömungsgeschwindigkeit war = 3681 ccm; 1 Minute nach dem Versuch = 2659 ccm; im Mittel = 3170 ccm.

Berechnen wir den respiratorischen Stoffwechsel aus den Gasen des Blutes und der Strömungsgeschwindigkeit, erhalten wir:

CO_2 = 368,4 ccm; O_2 = 397,5 ccm.

Das Ergebnis ist also:

Stoffwechsel bestimmt durch:	CO_2	O_2
Respirationsversuch . . .	363,6	357,3
die Gase des Blutes . . .	868,4	397,5
Differenz	÷ 4,8	÷ 40,2

Der aus dem Blut bestimmte Stoffwechsel ist, sowohl was die Kohlensäure als was den Sauerstoff betrifft, größer als der durch den Respirationsversuch bestimmte, der Unterschied ist aber so gering (4,08 und 11,2 %), daß er als innerhalb des Versuchsfehlers liegend zu betrachten ist. Der Versuch zeigt also wie die vorhergehenden, daß in der Lunge keine Verbrennung stattgefunden hat.

Versuch 9.

Hund. Gewicht 20 kg. Herz = 162 g. Verfahren wie im vorhergehenden Versuch. Vor dem Respirationsversuch wurde der Blutdruck durch Injektion einer geringen Menge Strophantin gesteigert. Der Blutdruck während des Versuches = 75 mm. Versuchsdauer = $3^3/_4$ Minuten. Gasuhr = 21,33 l; % CO_2 = 1,84; % O_2 Defizit = 2,25.

CO_2 ausgeschieden = 359,2; O_2 aufgenommen = 439,4; respiratorischer Quotient = 0,82.

In 100 ccm Blut aus:	CO_2	O_2	N_2
dem rechten Herzen I	38,70	4,15	1,04
" " " II	38,68	3,97	1,01
der Arterie I	27,51	16,30	1,27
" " II		verloren	

Mittlere Zahlen für das rechte Herz:

$$CO_2 = 38{,}69;\quad O_2 = 4{,}06;\quad \text{respir. Quotient} = \frac{11{,}18}{12{,}24} = 0{,}91.$$

Die Rhodannatriuminjektion ergab für $3^3/_4$ Minuten eine Strömungsgeschwindigkeit vor dem Respirationsversuch von 3275 ccm; nach dem Respirationsversuch 2769 ccm; im Mittel = 3022 ccm. Der aus den Gasen des Blutes und der Strömungsgeschwindigkeit berechnete Stoffwechsel:

CO_2 = 361,4 ccm; O_2 = 395,3 ccm.

Das Ergebnis des Versuches ist also:

Stoffwechsel bestimmt durch:	CO_2	O_2
Respirationsversuch . . .	359,2	439,2
Blut	361,4	395,3
Differenz	÷ 2,2	+ 44,1

Der Unterschied zwischen den Zahlen des durch den Respirationsversuch und des aus den Gasen und der Strömungsgeschwindigkeit des Blutes bestimmten Stoffwechsels ist auch in diesem Versuch so gering, daß man berechtigt sein darf,

anzunehmen, daß in den Lungen keine Verbrennung stattgefunden hat.

Zusammenfassung.

1. Durch Auspumpung und daraufolgende Analyse der Gase von defibriniertem Blut oder Oxalatblut kann man bei gleichzeitiger Bestimmung von 3 Proben gut übereinstimmende Resultate erzielen, wenn man dafür sorgt, daß das Blut während der Probeentnahme fortwährend in Bewegung gehalten wird, so daß eine Fällung der Blutkörperchen ausgeschlossen ist, und wenn die Proben schnell entnommen werden.

2. Bei langsamer Probeentnahme von Blut, das in den Gefäßen von Tieren zirkuliert, denen Hirudin intravenös injiziert worden ist, wird man nicht imstande sein, eine annäherungsweise so gute Übereinstimmung der Zahlen des Luftgehaltes im Blute zu erzielen, wie diejenige, die man bei der Anwendung von defibriniertem, während der Probeentnahme stets in Bewegung gehaltenem Blut erzielen kann. Dies beruht darauf, daß die Blutkörperchen der Hirudinwirkung wegen geneigt sind, in den verhältnismäßig langen Leitungen zu Boden zu sinken. Dies verursacht, daß die gleichzeitig entnommenen Blutproben keine durchaus einheitlichen sind.

3. Durch gleichzeitige Probeentnahme von Blut (und nachfolgender Auspumpung) aus dem rechten Herzen und aus der Arteria pulmonalis ist dargetan worden, daß das Blut aus den beiden Stellen denselben Gehalt von Kohlensäure und Sauerstoff hat. Blut aus dem rechten Herzen entspricht also in Zusammensetzung dem in die Lunge einströmenden Blut.

4. Es werden Versuche mitgeteilt, bei denen die Kohlensäureausscheidung und die Sauerstoffaufnahme durch die Lungen bestimmt werden gleichzeitig mit dem Gasgehalt des zur Lunge strömenden und des aus der Lunge kommenden Blutes. Vor und nach den Versuchen wird die Blutmenge bestimmt, die in der Zeiteinheit durch die Lungen strömt. Aus den gefundenen Zahlen geht hervor, daß die von Bohr und Henriques aufgestellte Lehre von einem besonderen Verbrennungsprozeß in den Lungen sich nicht aufrecht erhalten läßt.

Über Pflanzenenzyme.

IV. Die Invertase der Kartoffelblätter.

Von

P. Doby.

(Aus der kgl. ungarischen landwirtschaftlich-chemischen Versuchsstation in Magyaróvár.)

(Eingegangen am 25. September 1915.)

Die Invertase zählt zu den meist und eingehendst untersuchten Enzymen; trotzdem ist man sich jedoch noch immer nicht klar darüber, ob die Invertasen verschiedenen Ursprunges identisch sind[1]). Dieser Umstand, der in allgemein biochemischer Hinsicht theoretisches Interesse bietet, bewog mich, die Invertasen verschiedenen pflanzlichen Ursprunges zu untersuchen. Zufolge einiger bisheriger Untersuchungen[2]) wandte ich meine Aufmerksamkeit vor allem dem Laub der Kartoffelpflanze zu und, obzwar die diesbezüglichen Untersuchungen bloß begonnen sind, möchte ich über dieselben in folgendem kurz berichten, da ich vorläufig nicht imstande bin, dieselben binnen kurzem weiter zu verfolgen.

Bei den Versuchen wurde der Preßsaft der Blätter angewendet, um das unveränderte natürliche Enzymsystem untersuchen zu können. — Vor allem konnte die Anwesenheit der Invertase in den Blättern der Kartoffel bewiesen werden. Die Anwesenheit des Enzyms wurde auch durch die Kochunbeständigkeit, sowie dadurch bestätigt, daß die Reaktion den Charakter der monomolekularen Reaktionen zeigte. Der Wert der Reaktionskonstante war der Konzentration des Enzymes proportional. —

---

[1]) In Oppenheimers: „Die Fermente usw." IV. Aufl. 1913, 1, 207 heißt es z. B.: „Die einzelnen Invertasen scheinen etwas differenter Natur zu sein."

[2]) Doby: Zeitschr. f. Pflanzenkrankheiten 21, 321, 1911; 22, 204 und 401, 1912. Diese Zeitschr. 64, 111, 1914; 67, 166, 1914 und 68, 191, 1915.

Von den, mittels verschiedenen Druckes gewonnenen Preßsäften zeigte jener Saft die größte Aktivität, der mittels des geringsten Druckes dargestellt war. Diese Erscheinung kann die Folge verschiedener Ursachen sein; es ist z. B. möglich, daß hierfür die große Empfindlichkeit des Enzyms verantwortlich zu machen sei, worauf auch die verminderte Aktivität des einen Tag alten, antiseptisch aufbewahrten Preßsaftes hinweist. Möglich ist auch, daß durch den stärkeren Druck irgendwelche hemmende Stoffe aus den nunmehr vollständig zertrümmerten Zellen austraten[1]). Dies zu entscheiden muß weiteren Versuchen vorbehalten werden, die auch über die weiteren Eigenschaften dieser Invertase Aufklärung zu geben haben.

Experimentelles[2]).

Die enzymhaltigen Flüssigkeiten wurden auf folgende Weise dargestellt:

Die von den Stengeln abgepflückten Blätter wurden auf der Fleischhackmaschine zu einem Brei zerkleinert und durch Leinwand entweder mit den Händen, oder mittels der hydraulischen Presse ausgepresst. Sodann zentrifugierte man die aromatisch riechende, anfangs grüne, später fast schwarze Flüssigkeit, die dann zum Schlusse durch Asbest durchgesaugt wurde.

Als Substrat diente eine 5- bis 6 $^0/_0$ige Saccharoselösung; das Fortschreiten der Reaktion verfolgte ich bei den ersten Versuchen, da mir dabei das Klären der intensiv dunklen Versuchsflüssigkeit noch nicht gelang, mittels der Mohr-Bertrandschen Zuckertitration[3]). Auf diese Weise wurde die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration untersucht. Den Preßsaft gewann ich mittels der Buchnerschen Presse, bei einem Druck von 300 Atmosphären. Die Reaktionsflüssigkeit bestand aus 50 ccm einer etwa 12,5 $^0/_0$igen Saccharoselösung samt 1 ccm, bzw. 2 und

---

[1]) Auf diesen Umstand lenkte Herr Prof. Buchböck (Budapest) meine Aufmerksamkeit.

[2]) Die Versuche führte ich noch im Laboratorium der kgl. ungar. pflanzenphysiolog. und -pathol. Versuchsstation aus.

[3]) Bertrand, Bull. de la Société chimique **35**, 1285, 1906; s. auch Abderhaldens Handbuch **2**, 181, 1910.

4 ccm Preßsaft, aufgefüllt auf je 100 ccm mit einem Zusatz von 3 Volumen-% Toluol. Als Kontrollösung wurden dieselben Lösungen ohne Saccharose angesetzt. Den bei 38° im Brutschrank aufbewahrten Reaktionsflüssigkeiten wurde von Zeit zu Zeit eine entsprechende Menge entnommen und darin, nach Klärung mittels Bleiessig und Natriumsulfat, die Menge des Invertzuckers bestimmt. Der Zusatz von Bleiacetat diente auch zum Unterbrechen der Reaktion. Die Ergebnisse waren folgende:

Mit 1 ccm Preßsaft:

t' (Zeit in Minuten)	48	1368	2880	4253	5635	7102	8528	∞
Invertzucker g in 100 ccm . . .	0,061	0,496	0,904	1,158	1,416	1,732	2,236	6,42
$0{,}4343\,k\cdot 10^7$ . .	(865)	255	229	203	192	192	218	—

Mit 2 ccm Preßsaft:

t'	68	1368	2938	4253	5635	∞
Invertzucker g . .	0,049	0,860	1,650	2,248	2,884	6,42
$0{,}4343\,k\cdot 10^7$ . . .	490	456	439	440	460	—

Mit 4 ccm Preßsaft:

t'	116	1366	2936	∞
Invertzucker g	0,06	1,548	2,832	6,42
$0{,}4343\,k\cdot 10^7$	(352)	877	861	—

Die Werte der Konstante k berechnete ich nach der Gleichung $0{,}4343\,k = \frac{1}{t}\log\frac{a}{a-x}$ und — wie aus den Zusammenstellungen ersichtlich — stimmen dieselben gut überein. Die Abweichungen der ersten Werte bei 1 ccm und bei 4 ccm beruhen zweifellos auf infolge der geringen Menge des Invertzuckers entstandenen Fehlern.

Vergleicht man die Durchschnittswerte der Reaktionskonstanten der einzelnen Konzentrationen, so ergiebt sich eine strenge Proportionalität zwischen Enzymkonzentration und Reaktionskonstante, $\frac{k}{E}$ ist also konstant, wie aus folgender Zusammenstellung ersichtlich:

E	$0{,}4343\,k\cdot 10^7$	$\frac{k}{E}$
1	215	215
2	457	228
4	869	217

Die Darstellung des enzymhaltigen Preßsaftes auf die beschriebene Art war jedoch recht lästig und zeitraubend, daher trachtete ich dieselbe zu vereinfachen. Darum stellte ich vor allem Versuche in der Richtung an, ob die bei verschiedenem Druck erhaltenen Preßsäfte verschiedene Aktivität aufweisen. Die Versuche führten zu dem überraschenden Ergebnis, daß der mittels des geringsten Druckes — durch einfaches Auspressen mit den Händen — gewonnene Preßsaft der wirksamste sei, was die Darstellung des Preßsaftes außerordentlich vereinfachte.

Der Verlauf der Reaktion wurde bei diesen Versuchen durch das optische Verhalten verfolgt, da das Messen des Reduktionsvermögens zu langwierig war und es mir inzwischen gelang, die Reaktionsflüssigkeit ganz klar zu erhalten. Der Vorgang gestaltete sich wie folgt:

5 ccm der Reaktionsflüssigkeit wurden mit 0.3 ccm Bleiessig, dann mit 0,6 ccm einer 20 %igen Natriumsulfatlösung versetzt und nach Abzentrifugieren des Niederschlages zu 4 ccm der klaren Flüssigkeit 1 ccm einer 20 %igen Sodalösung gegeben. Nach abermaligem Zentrifugieren konnte die Flüssigkeit, die nunmehr farblos war, polarisiert werden. Es gelang auf diese Weise, lauter sich gut setzende Niederschläge und in kürzester Zeit völlig wasserklare Flüssigkeiten zu erhalten, währenddem es z. B. bei Weglassung des Natriumsulfates unmöglich war, die Lösungen zu polarisieren. Ebenso waren auch andere Mittel, z. B. Schwefel- oder Oxalsäure unbrauchbar, da diese stets so viel farbige Bestandteile in Lösung hielten, daß das Polarisieren unmöglich war.

Die angewandten Reagenzien übten auf das Drehungsvermögen der Lösungen keinen Einfluß aus, wie dies aus folgender Zusammenstellung erhellt:

Substrat	ccm Substrat	Bleiessig	Na_2SO_4	ccm von der bisherigen Lösung	Na_2CO_3	H_2O	α
Eine etwa 6,3-%ige Saccharoselösung	5,0	—	—	—	—	2,5	+ 5,37°
	5,0	0,4	0,6	4,0	1,0	—	+ 5,38°
1 g Fruktose + 1 g Glukose in 40 ccm Lösung	5,0	—	—	—	—	2,5	— 1,29°
	5,0	0,4	0,6	4,0	—	1,0	— 1,28°
	5,0	0,4	0,6	4,0	1,0	—	— 1,28°

Um nun den Einfluß des Pressens auf die Aktivität zu bestimmen, wurde der Blätterbrei wie folgt verarbeitet:

A: In Preßleinwand mittels den Händen ausgepreßt;

B: Der Rückstand von A bei 100 Atmosphären und

C: Der Rückstand von B bei 300 Atmosphären ausgepreßt.

Außer diesen drei Enzymflüssigkeiten diente noch die Flüssigkeit A nach 24stündigem antiseptischen Aufbewahren bei Zimmertemperatur zu einem Versuch über die Haltbarkeit der Enzymflüssigkeit: A 24.

Von diesen Flüssigkeiten wurden je 2 ccm samt 50 ccm einer 10 %igen Rohrzuckerlösung auf 100 ccm aufgefüllt und im Brutschrank antiseptisch aufbewahrt. In den Kontrollflüssigkeiten kamen aufgekochte Enzymlösungen zur Anwendung. Die Ergebnisse folgen:

A.

Mit der Hand ausgepreßt.

t'	α	Drehungsänderung	x (g hydrolysierten Rohrzuckers in 100 ccm)	$0{,}4343\, k \cdot 10^7$
15	+ 4,47°	0°	0	—
278	+ 4,27°	0,20°	0,17	(462)
1354	+ 3,37°	1,10°	0,95	664
2746	+ 2,55°	1,92°	1,66	630
4207	+ 1,79°	2,68°	2,32	636
5685	+ 1,18°	3,29°	2,84	633
5848	+ 1,11°	3,36°	2,90	638
7075	— 0,58°	3,89°	3,36	673
∞	— 1,36°	5,83°	5,04	—
			Mittel:	644

A 24.

Wie A, aber 24 Stunden später angesetzt.

6	+ 4,43°	0°	0	—
1495	+ 3,27°	1,16°	1,00	648
2917	+ 2,53°	1,90°	1,64	594
4383	+ 1,80°	2,63°	2,27	598
6333	+ 1,23°	3,20°	2,79	560
∞	— 1,35°	5,78°	5,00	—
			Mittel:	600

B.

Bei 100 Atmosphären Druck ausgepreßt.

4	+ 4,39°	0°	0	—
277	+ 4,33°	0,06°	0,05	(156)
1314	+ 3,90°	0,49°	0,42	285
2795	+ 3,32°	1,07°	0,92	322
4217	+ 2,84°	1,55°	1,34	324
5646	+ 2,50°	1,89°	1,63	307
∞	— 1,34°	5,73°	4,95	—
			Mittel:	310

C.

Bei 300 Atmosphären Druck ausgepreßt.

t'	α	Drehungsänderung	x (g hydrolysierten Rohrzuckers in 100 ccm)	$0,4343\ k \cdot 10^7$
2	+ 4,44°	0°	0	—
277	+ 4,32°	0,12°	0,10	311
1339	+ 3,90°	0,54°	0,47	309
2743	+ 3,46°	0,98°	0,85	289
4165	+ 3,06°	1,38°	1,19	281
5631	+ 2,75°	1,69°	1,46	266
∞	— 1,35°	5,79°	5,01	—
			Mittel:	291

Die Drehungswinkel der Kontrollösungen blieben stets zwischen + 4,45° und + 4,39° und betrugen im Mittel + 4,41°.

Die Durchschnittswerte von k sind also folgende:

Bei dem mit den Händen ausgepreßten Saft 644
„ „ „ „ „ „ „ nach 1 Tage 600
„ 100 Atmosphären ausgepreßt 310
„ 300 „ „ 291

Man sieht, daß die Aktivität schon durch 24 stündiges antiseptisches Aufbewahren abnahm; eine noch wesentlichere Beeinträchtigung trat jedoch infolge des großen Druckes ein. Es ist schwer, sich über die Ursache dieser Erscheinung einen Begriff zu verschaffen[1]). Das Auspressen des Blätterbreies geschah sehr vorsichtig und allmählich so, daß es für ausgeschlossen anzusehen ist, daß das Enzym infolge Erhitzens gelitten hätte. Übrigens scheint es, daß sich nicht nur die Konzentration des Enzyms verminderte, sondern daß es auch schneller zugrunde ging, als der bei geringem Drucke gewonnene Saft, denn in C sank der Wert der Geschwindigkeitskonstante zwar allmählich, aber fortwährend als Zeichen einer allmählichen Verminderung seiner Konzentration im Laufe des Versuches.

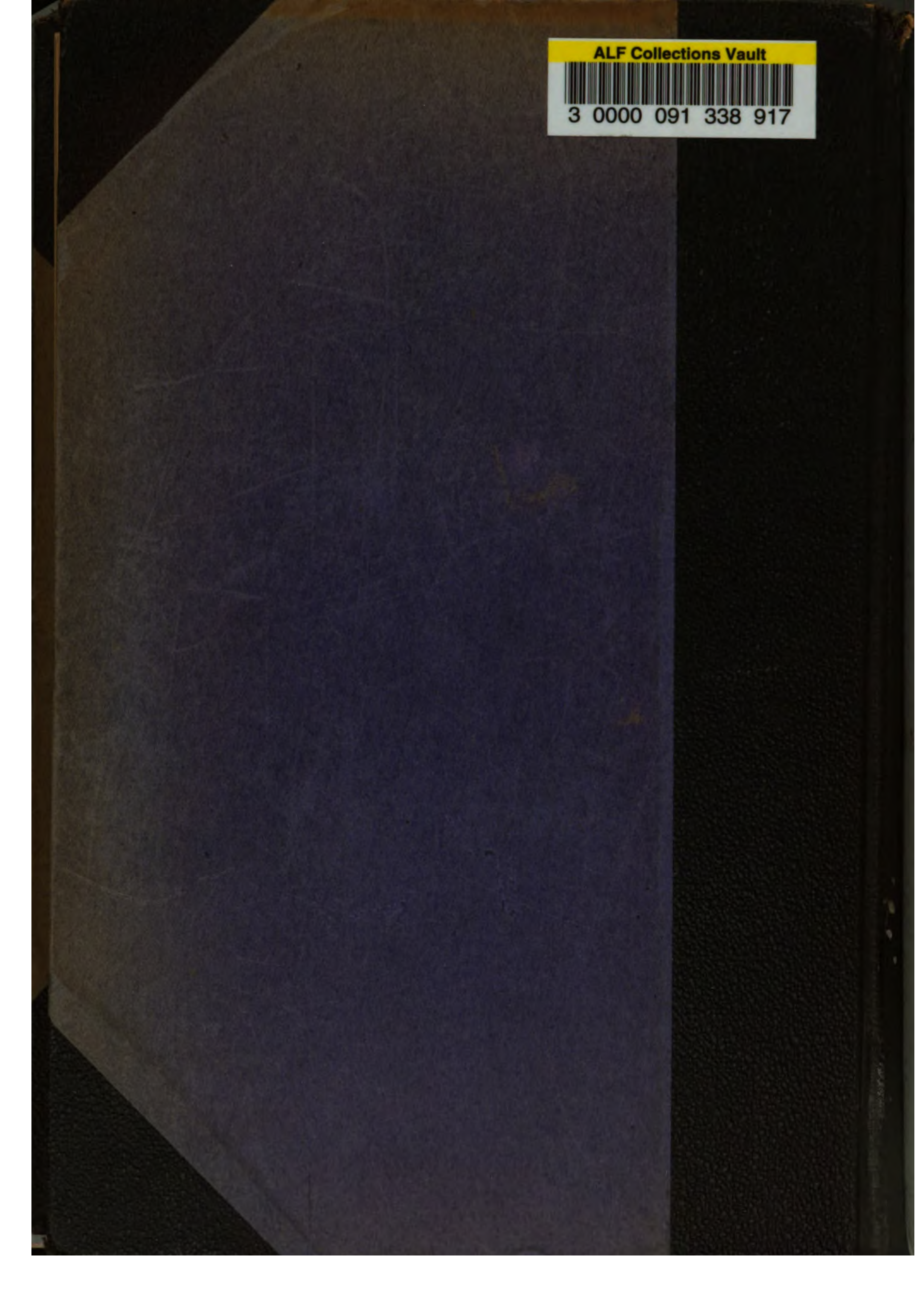
Ich beabsichtige, die Untersuchung dieser Invertase fortzusetzen.

[1]) Siehe hierzu die Anmerkung 1) auf Seite 496.

Autorenverzeichnis.






ALF Collections Vault
3 0000 091 338 917